

(54) Int.Cl. ¹	識別記号	F I	ナコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/06	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
- C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/06	Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全100頁)

(21) 出願番号 特願2000-528713(P2000-826713)
 (86) (22) 出願日 平成11年1月26日(1999.1.26)
 (85) 優先文提出日 平成12年7月25日(2000.7.25)
 (86) 国際出願番号 P C T / G B 9 9 / 0 0 2 6 9
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 3 7 8 0 6
 (87) 国際公開日 平成11年7月29日(1999.7.29)
 (31) 優先権主張番号 9 8 0 1 6 2 8 . 0
 (32) 優先日 平成10年1月27日(1998.1.27)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)
 (31) 優先権主張番号 9 8 0 9 0 1 4 . 5
 (32) 優先日 平成10年4月29日(1998.4.29)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)

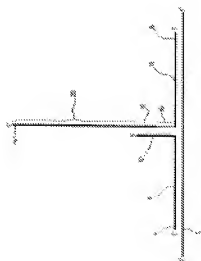
(71) 出願人 サイテセル・リミテッド
 イギリス、オー・エックス・17 3・エ
 ス・エヌ オックスフォードシャー、パン
 ベリー、アダーベリー、トリニティ・ウェ
 イ、ゾマービル・コート、ユニット・6
 (番地なし)
 (72) 発明者 ウェストン、アンソニー
 イギリス、ユー・ビー・5 4・ビー・エ
 フ ミドルセックス、ノースホルト、ドル
 チェスター・クロウス、ニュー・コート、
 8
 (74) 代理人 弁護士 深見 久郎 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸配列プローブおよびその使用

(57) 【要約】

【解決手段】 試料を第1および第2のプローブと接触させること（ここに、第1のプローブは、関心のある配列に相補的であってそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列に非相補的である部分とを含み、また第2のプローブは、関心のある配列に相補的であってそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列には非相補的であるが第1のプローブの関心のある配列に非相補的な部分には相補的である部分とを含み、第1および第2のプローブは、第1および第2のプローブの相補的部分が互いにハイブリッド形成できるように、隣接して、または実質的に隣接して、関心のある配列にハイブリッド形成できるようになっている）；第2のプローブを標型とし、核酸ポリメラーゼを使って第1のプローブの伸長を引き起こすこと；および関心のある配列の存在を示すために、第1のプローブの伸長を直接または間接的に検出することからなる。試料中の関心のある核酸配列を検出する方法であって、第1および/または第2のプローブが、相互のプローブと塩基対形成できずそのために関心のある配列の不在下での



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 試料を第1および第2のプロープと接触させること（ここで、第1のプロープは、関心のある配列に相補的であってそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列に非相補的である部分とを含み、また第2のプロープは、関心のある配列に相補的であってそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列には非相補的であるが第1のプロープの関心のある配列に非相補的な部分には相補的である部分とを含み、第1および第2のプロープは、第1および第2のプロープの相補的部分が互いにハイブリッド形成できるように、隣接して、または実質的に隣接して、関心のある配列にハイブリッド形成できるようになっている）、(b) 第2のプロープを鋳型とし、核酸ポリメラーゼを使って第1のプロープの伸長を引き起こすこと、および(c) 関心のある配列の存在を示すために、第1のプロープの伸長を直接または間接的に検出することからなる、試料中の関心のある核酸配列を検出する方法であって、第1および/または第2のプロープが、相互のプロープと塩基対形成できずそのために関心のある配列の不在下での第1のプロープと第2のプロープのハイブリッド形成を妨げる不安定化部分を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 第1および第2のプロープがDNA、RNA、PNA、LNA、またはそれらの組み合わせからなる請求項1に記載の方法。

【請求項3】 不安定化部分がヘキサエチレングリコール、ペンタメチレンまたはヘキサメチレンからなる請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 不安定化部分が第2のプロープ中に存在する請求項1、2または3のいずれか一つに記載の方法。

【請求項5】 第1または第2のプロープが、関心のある配列へのハイブリッド形成によって第1または第2のプロープ中および/または関心のある配列中に不對核酸塩基のループが形成されるようになっている請求項1～4のいずれか一つに記載の方法。

【請求項6】 関心のある配列への第1または第2のプロープのハイブリッド形成によって第1または第2のプロープ中および/または関心のある配列中に2または3不對核酸塩基のループが形成される請求項5に記載の方法。

【請求項7】 第1および第2のプロープを既知の核酸配列を持つ対照核酸と接触させる対照反応を含む請求項1～6のいずれか一つに記載の方法。

【請求項8】 第1のプロープの伸長が活性な核酸プロモーターの形成をもたらす請求項1～7のいずれか一つに記載の方法。

【請求項9】 第1のプロープの伸長がT3、T7またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーターの形成をもたらし、それが第2のプロープの少なくとも一部の多数のRNAコピーの転写を可能にする請求項8に記載の方法。

【請求項10】 活性な核酸プロモーターから合成された核酸の検出が第1のプロープの伸長の間接的検出を可能にする請求項8または9に記載の方法。

【請求項11】 活性な核酸プロモーターによって引き起こされる転写がリボザイム活性を持つ核酸配列の合成をもたらす請求項8、9または10のいずれか一つに記載の方法。

【請求項12】 核酸が検出に先立って増幅工程にかけられる請求項1～11のいずれか一つに記載の方法。

【請求項13】 第1のプロープの伸長の直接的または間接的結果として合成された核酸がさらなる核酸プロープとのハイブリッド形成によって検出される請求項1～12のいずれか一つに記載の方法。

【請求項14】 さらなる核酸プロープが分子ビーコンを構成する請求項13に記載の方法。

【請求項15】 第1のプロープの伸長の直接的または間接的結果として合成された核酸が固体表面で捕捉される請求項1～14のいずれか一つに記載の方法。

【請求項16】 関心のある核酸配列を検出する方法で使用するための一対の核酸プロープであって、その対の第1のプロープは、関心のある配列に相補的でありそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列に非相補的である部分とを含み、またその対の第2のプロープは、関心のある配列に相補的でありそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列には非相補的であるが第1のプロープの関心のある配列に非相補的な部分には相補的である部分とを含み、第1および第2のプロープは、第1および第2のプロープの

相補的部分が互いにハイブリッド形成できるように、隣接して、または実質的に隣接して、関心のある配列にハイブリッド形成できるようになっており、その第1および/または第2のプロープが、そのプロープの対の相互の要素と塩基対形成できずそのために関心のある配列の不在下での第1のプロープと第2のプロープのハイブリッド形成を妨げる不安定化部分を含むことを特徴とする一対の核酸プロープ。

【請求項17】 請求項1～15のいずれか一つに記載の方法で使用するための請求項16に記載の一対のプロープ。

【請求項18】 請求項16に記載の一対のプロープと適当な包装手段とを含む、試料中の関心のある核酸配列の存在を検出する際に使用するためのキット。

【請求項19】 請求項1～15の何れか一つの方法を実施する際に使用するための請求項18に記載のキット。

【請求項20】 下記の1つ以上をさらに含む請求項18または19に記載のキット：DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、リボ―またはデオキシリボヌクレオチド三リン酸類（標識されたもの、または標識されていないもの）、標識試薬類、検出試薬類、緩衝剤類。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明は、核酸増幅法を改良するためにオリゴヌクレオチドブロープに不安定化部分を導入すること、そのようなオリゴヌクレオチドの使用を伴う方法、および核酸増幅法を実施するためのキットであってそのようなオリゴヌクレオチドブロープを含むものに関する。とりわけ本発明は、反応の感度と特異性が増すような、ハイブリッド形成させた修飾核酸ブロープの増幅に関する。

【0002】

【発明の背景】

本発明は、核酸増幅法を改良するためにオリゴヌクレオチドブロープに不安定化部分を導入すること、そのようなオリゴヌクレオチドの使用を伴う方法、および核酸増幅法を実施するためのキットであってそのようなオリゴヌクレオチドブロープを含むものに関する。とりわけ本発明は、反応の感度と特異性が増すような、ハイブリッド形成させた修飾核酸ブロープの増幅に関する。

【0003】

本明細書で言及する刊行物はすべて参照により本明細書の一部を構成する。

多くの核酸増幅法が文献に引用され、公開された欧州特許出願やPCT特許出願に開示されている。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）として知られるそのような方法の一つはUS 4,683,195とUS 4,683,202に開示されている。PCR法はDNA二本鎖の相対する鎖にアニールする核酸プライマーからなり、これらのプライマーが耐熱性DNAポリメラーゼを使ってヌクレオチド三リン酸の存在下に伸長されて、元の核酸配列の二本鎖コピーを2つ与える。変性、アニーリングおよび伸長のサイクルを連続して行なうことで、元の核酸配列のコピーがさらに増幅される。この方法には、反復される熱サイクリングに關係して中間温度（例えば50℃～55℃）と高温（90℃～95℃）の間で反応温度を交互に調節する必要があるなどの欠点がある。また、核酸配列の増幅を達成するために大きな温度移行のサイクルを多数回行なうのに必要な時間尺度と、その核酸配列の増幅されたコピーにおける配列エラーの発生は、長い配列区間の多重コピー中にエラー

が起こるので、重大な短所である。さらにまた、増幅された核酸配列の検出は、一般的には、例えばアガロースゲル電気泳動などのさらなる処理を必要とする。

【0004】

これに代わる核酸増幅法はWO88/10315 (Siska Diagnostics社)、EP329,822 (Cangene社)およびEP373,960 (Siska Diagnostics社)、US5,554,516 (GenProbe社)およびそれぞれBurgaらとGingerasらに譲渡されたWO89/1050とWO88/10315に開示されている。これらの増幅法には、交互に行なわれるDNA合成とRNA合成からなるサイクリング反応が記述されている。この交互RNA/DNA合成は主として、転写プロモーターを含むオリゴヌクレオチドを特定のDNA配列に隣接してアニーリングさせることを行なわれる。そのように生成された特定配列のRNAコピー、あるいは特定のRNA配列を含む投入試料(US5,554,516)は、次に核酸プライマーを用いてDNA鎖としてコピーされ、その結果生じるDNA:RNAハイブリッドからRNAが変性(WO88/10315)によって除去されるか、RNアーゼH(EP329822、EP373960およびUS5554516)を使って除去される。次に、RNA生成を繰返すために、転写プロモーターを形成するオリゴヌクレオチドのアニーリングが繰返される。

【0005】

このように増幅は主として、効率のよいRNAポリメラーゼを使ってDNA鋳型に対して過剰のRNAコピーを生成させることによって達成される。RNアーゼ型のこの方法は、増幅を潜在的に単一の温度(すなわち等温で)達成できるという点で、PCRに対して大きな利点を持つ。また、PCRよりはるかに高いレベルの増幅を達成できる。すなわち、T7 RNAポリメラーゼを使うと10~100個のRNAコピーが生成するのに対して、PCRでは1サイクルにつきDNAコピー数が倍増するに過ぎない。EP329822に記載のDNA:RNAサイクリング法に伴う短所は、転写プロモーターを作るためのオリゴヌクレオチドのアニーリングに個別の末端を持つ試験核酸を必要とする点である。これは例えば長いDNA分子中の特定遺伝子の検出を困難にする。この方法のさらなる短所は、DNA:RNAサイクリングを企てるのに少なくとも3種類の酵素を必要とし、それが安定性、コストおよび再現性に有害

な結果をもたらす可能性があること、増幅された核酸配列の検出には1つまたはそれ以上のさらなる工程（例えばゲル電気泳動）がしばしば必要とされることである。

【0006】

上述の方法はいずれも、特定の核酸領域が直接コピーされ、それらの核酸コピーがさらにコピーされて増幅が達成される方法にあたる。様々な核酸配列間の多様性ゆえに、同じ方法でも配列が異なると増幅速度はおそらく異なり、したがって例えば、特定の核酸の元の量を定量する際に問題が生じる。

【0007】

上に挙げた方法はそれらの標的核酸の増幅に関して多くの短所を持つ。そこで、特定標的核酸配列の高感度検出に切望される事項の一覧を以下に略述する：

- a) その方法は好ましくは標的配列の複写を必要としないべきである；
- b) その方法は好ましくは長い配列の区間の多重複写を伴わないべきである；
- c) その方法は好ましくは個別の末端を持たない特定配列を含むDNA標的配列とRNA標的配列のどちらにも広く応用できるべきである；
- d) シグナルは、好ましくは、2つの異なるプローブまたはプローブの領域の、標的配列への、独立したハイブリッド形成からもたらされるべきである；また、
- e) その方法は、ハイブリッド形成させたプローブを何の追加処理も行わずに検出するためのオプションを含むべきである。

【0008】

上述の要求を満たす核酸増幅法はWO93/06240 (Cytocell社) に開示されている。2つの増幅法が記述されていて、一つは熱的方法であり、もう一つは等温法である。熱型と等温型はどちらも、標的核酸に相補的な領域を持つ2つの核酸プローブのハイブリッド形成に依存する。該プローブの一部分は、第1および第2のプローブの相補的な「アーム」特異配列が相互にアニールした状態になることができるように、それらのプローブが互いに隣接または実質的に隣接するような形で、関心のある配列にハイブリッド形成する能力を持つ。アニーリングに続いて、プローブの一方の鎖の伸長が、他方のプローブの一部を鋳型として達成される。

【0009】

増幅は2つの手段のうちの1つで達成される。熱サイクル型では、伸長された第1のプロープの新しく合成された配列の一部に実質的に相補的な、さらなるプロープのハイブリッド形成が可能になるように、伸長された第1のプロープの熱分離が行なわれる。伸長された第1のプロープを鋳型とし、適切なポリメラーゼを用いて、そのさらなるプロープの伸長が達成される。伸長された第1のプロープとさらなるプロープ産物の熱分離により、これらの分子はさらなる第1のプロープ分子を伸長させるための鋳型として作用でき、伸長された第1のプロープは、他のさらなるプロープ分子を伸長させるための鋳型として作用できる。等温型では、第1のプロープのプライマー伸長が、関連RNAポリメラーゼの存在下に多数コピーのRNAを転写する機能的RNAポリメラーゼプロモーターを生成させる。得られたRNAは、さらなるRNAポリメラーゼプロモーター配列を含有する相補的DNAオリゴヌクレオチドの相互作用（その結果、そのDNAオリゴヌクレオチドへのRNAのアニールングと、それに続く伸長反応とが、さらにもう一巡のRNA合成をもたらす）の結果として、さらに増幅される。この循環的方法によって大量のRNAが生成し、その検出はいくつかの手段で達成できる。本発明はこれらの方法に関係し、それに改良を施すことを目的とする。

【0010】

【発明の要約】

好ましい態様では、本発明も上述した要件の全てを満たす。これは、関心のある標的配列の存在下にその標的と2つのプロープとが「三元接合部（three way junction）」を形成するような、相補的標的特異領域と相補的アーム領域とを含有する2つのオリゴヌクレオチドプロープのハイブリッド形成によって達成できる。オリゴヌクレオチドプロープの一方または両方の相補的アーム領域には、それら2つのオリゴヌクレオチドプロープが標的核酸の不在下でも会合することを防いでそれらのプロープの潜在的会合に由来するノイズを減少させる不安定化部分が組み込まれる。

【0011】

第1の側面として本発明は、関心のある核酸標的配列を検出する方法で使用する

るための一対の核酸プローブであって、第1のプローブは、関心のある配列に相補的でありそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列に非相補的である部分とを含み、また第2のプローブは、関心のある配列に相補的でありそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列には非相補的であるが第1のプローブの関心のある配列に非相補的な部分には相補的である部分とを含み、第1および第2のプローブは、第1および第2のプローブの相補的部分が互いにハイブリッド形成できるように、隣接して、または実質的に隣接して、関心のある配列にハイブリッド形成できるようになっており、その第1および/または第2のプローブが、そのプローブ対の相互の要素と塩基対形成できずそのために関心のある配列の不在下での第1のプローブと第2のプローブのハイブリッド形成を妨げる不安定化部分を含むことを特徴とするものを提供する。

【0012】

標的鎖は、関心のある任意の核酸（RNA、またより好ましくはDNA）配列、例えば（その複合体を病原体の存在の検出に使用できるように）病原体由来の配列などからなってもよいし、あるいはヒトまたは動物の個体の遺伝子型を決定できるように、特定のヒト、動物または植物の対立遺伝子の配列であってもよい。少なくとも、標的のうち、二本鎖プロモーターの第2の鎖の一部を含有する部分（通例2〜4塩基）が、好ましくはDNAからなると好都合である（ただしその必要はない）。標的鎖はDNAおよび/またはRNAの両方からなりうる。

【0013】

第1および第2のプローブの相互のハイブリッド形成および関心のある配列とのハイブリッド形成は、本発明者らが「三元接合部」と呼ぶ構造を形成する。第1のプローブと第2のプローブは好ましくはDNA、PNA（ペプチド核酸）またはLNA（「ロックド核酸（locked nucleic acid）」からなるが、RNAや、上述したものの任意の組み合わせからなってもよい。

【0014】

PNAは、糖/リン酸エステル主鎖がペプチド結合鎖（通例、反復されたN-（2-アミノエチル）グリシン単位の鎖）で置き換えられていて、そこにメチレンカルボニル結合によって塩基がつながれている合成核酸類似体である。DNAでは著

しく負に帯電したリン酸エステル主鎖が各鎖間の静電反発を引き起こすが、PNAの主鎖は帯電していないので、PNA/DNAハイブリッドは二本鎖DNA分子に比べて高いTm値を持つ。PNAのもう一つの特徴は、塩基ミスマッチが、ヘテロ二本鎖DNA中の塩基ミスマッチよりも、相対的に言って、不安定化性が強いことである。したがって、PNAを本発明で使用されるプローブに含めると、得られるプローブはもっぱらDNAからなるプローブよりも高い特異性を持つので有利だろう。PNAの合成と使用は、例えばOrumら(1993 Nucl. Acid Res. 21, 5332)、Egholmら(1992 J. Am. Chem. Soc. 114, 1895)およびEgholmら(1993 Nature 365, 566)などに開示されている。

【0015】

LNAは、「内部架橋された」ヌクレオシド類似体を組み込んだ合成核酸類似体である。LNAの合成とその特性は、次のように多くの著者によって記述されている：Nielsenら(1997 J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 3423)；Koshkinら(1998 Tetrahedron Letters 39, 4381)；SinghおよびWengel(1998 Chem. Commun. 1247)；Singhら(1998 Chem. Commun. 455)。PNAの場合と同様に、LNAはDNAと組み合わせると、従来のDNA/DNAヘテロ二本鎖よりも高い熱安定性を示す。しかしLNAは従来の核酸合成機で合成でき、一方、PNAは従来の核酸合成機では合成できない。一本鎖PNA/DNAキメラを形成させる場合、PNAをDNAにつなぐには特殊なリンカーが必要になる。これに対し、LNAは、従来の技術でDNA分子に簡単に繋ぐことができる。したがってLNAは、本発明のプローブでの使用に関して、いくつかの点でPNAより好ましい。

【0016】

具体的に述べると、2つのプローブの標的的特異領域はLNAおよび/またはPNAを含んでもよく、アーム領域はDNAからなって、それらプローブの一方または両方は不安定化部分を含む。PNAは既知のどの核酸ポリメラーゼによっても鋳型として認識されないの、PNAを含んでなるキメラプローブ分子は、キメラ鋳型のPNA部分をコピーする必要がない態様でのみ有用である。

【0017】

第1のプローブと第2のプローブが、標的配列にハイブリッド形成させた時に

、互いに隣接または実質的に隣接することは、本発明の基本的特徴である。「隣接する」という用語の使用は、ここでは、標的配列のうち、プローブの相補配列と塩基対形成する部分の間に、塩基対形成しないで残される標的配列のヌクレオチドが存在しないことを意味するものとする。このプローブ間の接近は、プローブの標的相補配列がアニールすることを可能にする。当業者にはすぐ明らかになるように、標的配列からもっと離れたところで互いにアニールできるようにプローブを設計することによって、プローブがハイブリッド形成する標的ヌクレオチド配列中の部位間にギャップを導入することができる。この状況では、標的配列のうち、プローブに塩基対形成する部分の間に、塩基対形成しないで残される標的配列のヌクレオチドがいくつか存在しうるので、それらのプローブは「実質的に隣接する」といわれる。標的配列の介在不对ヌクレオチドの数が、プローブの設計次第で変化しうことは明らかである。したがって、第1のプローブと第2のプローブは隣接するようにハイブリッド形成することが好ましいのであるが、それらのプローブは、5ヌクレオチドまでの標的配列で分離されてもよく、「実質的に隣接する」という用語は、そのような状況を指すものとする。

【0018】

第2の側面として、本発明は、関心のある核酸標的配列を検出する方法であって、上述した第1の側面に従う一対のプローブを関心のある配列にハイブリッド形成させ、新たに合成された核酸が形成されるように（例えばWO93/06240またはUS5,545,516（これらの内容は参照により本明細書の一部を構成する）に記述されているように）そのプローブの一方を、他方のプローブを鋳型として伸長させ、新たに合成された核酸を直接または間接的に検出することからなる方法を提供する。活性な核酸プロモーターが形成されて、例えば第2のプローブの多数のRNAコピーの生成などによって増幅が起こりうるように、第2のプローブを鋳型として第1のプローブを伸長することが極めて好ましい。通例、増幅が促進されるように、1つまたはそれ以上のさらなる核酸プローブが適切なポリメラーゼの存在下に導入される。好ましい態様では、多重増幅をもたらすサイクリング増幅が確立される。そのような増幅がどのようにして得られるかの詳細については、下記の実施例とWO93/06240に記載する。

【0019】

新たに合成された核酸は、第2のブロープの鋳型部分と共に、例えばT3、T7またはSP6 RNAポリメラーゼによって、もしくは当業者に知られているそれらの突然変異型のいずれかによって認識されるRNAポリメラーゼプロモーターを形成することが望ましい。RNAまたはDNAを合成でき、本発明方法を実施する際に役立つ、突然変異型RNAポリメラーゼが知られている（Kostyukら、1995 FEBS Letts. 369, 165-168）。

【0020】

したがって好ましい態様では、（不安定化部分を持つまたは持たない）第2のブロープのアーム領域が、（不安定化部分を持つまたは持たない）第1のブロープのアーム領域に相補的な配列と、選択されたユニーク配列（例えばRNAポリメラーゼプロモーター配列、転写の効率を向上させるための「+12領域」などだが、これらに限るわけではない）とを含み、これにブロープ検出および捕捉配列が続く。

【0021】

説明のために、本発明者らは、RNAポリメラーゼプロモーターによるRNA合成の開始の効率が、そのプロモーターに隣接して下流にある配列によって左右されることを見出した。具体的に述べると、最適なRNA転写には12塩基の領域（「+12領域」）が必要である。したがって、第2のブロープの転写される鋳型部分は、そのプロモーターを認識するポリメラーゼに適した+12領域を含むことが好ましい。本発明者らはT7ポリメラーゼに関して最適な+12領域を解明した（以下に、より詳細に議論する）が、これが例えばT3ポリメラーゼやSP6ポリメラーゼにも最適であるかどうかは現時点ではわかっていない。SP6ポリメラーゼやT3ポリメラーゼは異なる最適+12領域を持つことも考えられるが、もしそうだとすれば、この開示を利用して試行錯誤により適切な配列を同定することは、当業者にとっては簡単なことだろう。

【0022】

プロモーター鎖の鋳型部分への包含に関して、好ましい+12領域の配列を、下記の表1に示す。最も活性的な+12領域（最大の転写を与えるもの）が一番上

にあり、他の配列は好ましさが減っていく順番に示してある。

表1 T7 ポリメラーゼ用の鋳型+1～+12配列の選択肢。転写効率が低下する順番に記載（それぞれ配列番号1～10）

5' ATCGTCAGTCCC 3'
 5' GCTCTCTCTCCC 3'
 5' ATCCTCTCTCCC 3'
 5' GTTCTCTCTCCC 3'
 5' GATGTGTCTCCC 3'
 5' GTTGTGTCTCCC 3'
 5' ATCCTCGTGCCC 3'
 5' GCTCTCGTGCCC 3'
 5' GTTCTCGTGCCC 3'
 5' GTTGTGTGTGCCC 3'

（5'塩基には+1（プロモーター配列の末端から下流に1番目の塩基である）という番号を割り当て、3'塩基には+12を割り当てる。）

さらにもう一つの態様として、複合体の鋳型部分（好ましくプロモーター鎖上の鋳型部分）は、新規合成されたRNAコピーを同定、検出または増幅するために使用できる配列を含有できるだろう（例えばWO93/06240、US5,554,516を参照されたい。あるいは、例えばTyagiおよびKramer 1996 *Nature Biotech* 14, 303-308に開示されているような分子ビーコン配列を用いる）。これらの配列は（上述のように）+12領域に隣接してその下流に置くことと便利であり、次に挙げる配列の1つまたはそれ以上（ただしこれらに限らない）を含有する：ユニークな「分子ビーコン」配列；捕捉配列；検出プローブ相補配列；等温増幅サイクリング反応の代替RNAプロモーター配列（下記参照）。本発明にとりわけ役立つ一つのユニーク配列は、*Streptomyces brasiliensis* 由来の16SリボソームRNAの塩基791～820（Stackebrandtら、1991 *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1468-1477）によって与えられ、その配列は既知のヒトDNAまた既知のヒト病原体のDNAのいずれとも整合しない。

【0023】

リボヌクレオチド三リン酸類（RNAポリメラーゼによるRNAの合成用）とdNTP類（DNAポリメラーゼによるDNAの合成用）の両方を含む混合物の使用が本発明に伴う態様（例えばプライマー伸長に続いて等温増幅を行なう場合）では、過剰な濃度のdNTP類はRNAポリメラーゼによって合成されるRNAの量を減少させることが本発明者らによって見出されたので、混合物中のdNTP類の濃度は50 μ Mを超えない（好ましくは10 μ Mを超えない）ことが好ましいだろう。

【0024】

ある特定の態様として、本発明は、関心のある配列の存在と、密接に関係するその変異種であって関心のある配列との相違点がわずかに1塩基（例えば点変異）であってもよいものの存在とを識別する方法を提供する。適切なプローブ配列を選択することにより、本発明方法の性能を、試料中に存在する配列が関心のある配列であるかそれともその変異種であるかに依存して、極めて異なる結果をもたらすようにすることができる。具体的に述べると、第1のプローブと標的の間および/または第2のプローブと標的の間の不對塩基の存在は、活性なプロモーターから合成される核酸の量に驚くべき影響をもつことが見出された。

【0025】

一般に、関心のある配列と対を形成しない少数（例えば1～3個）の塩基を導入するような第1のプローブの設計が、そのプロモーターから合成される核酸の量を減少させる傾向を持つことを見出した。逆に、全く予想外なことに、本発明者らは、関心のある配列と対を形成しない少数（例えば1～3個）の塩基の、第2のプローブ中での存在は、そのプロモーターから合成される核酸の量を減少または増加させることを見出した（不對塩基はプローブの「アーム」部分の近くにあるので、いくつかの態様ではその不對塩基を標的的非相補アームの続きと見ることができる）。第1のプローブと対を形成しない（核酸合成の減少を引き起こす傾向がある）か、第2のプローブと対を形成しない（逆の効果をもつ傾向がある）塩基が標的配列中にありうる場合にも、等価な状況が見られる。いくつかの態様では、標的と、一方または両方のプローブとの両方が、不對塩基を含有する。

【0026】

特定の理論に縛られることは望まないが、本発明者らの仮説の一つは、第2のブロープ（通常これは不安定化部分も含む）と標的の間の不對塩基の存在は、ある状況では生成する複合体の柔軟性を増し、それによってかさ高いポリメラーゼ分子のプロモーターへの接近が容易になり、結果としてシグナルを増加させうるというものである。他の状況では、不對塩基の存在が第1および/または第2のブロープと標的の間の相互作用を不安定化することで、シグナルの量を減少させる。

【0027】

したがって本発明者らは、最適な効果を得るには、第2のブロープと関心のある配列の間にミスマッチが含まれる状態は、好ましくは不安定化部分に隣接または実質的に隣接する（すなわち、好ましくは不安定化部分の5塩基以内にある）べきだと考える。

【0028】

第2のブロープは不安定化部分を含むが第1のブロープはそれを含まない特定の態様（とりわけその不安定化部分が後述するようにHex二量体を含む場合）では、第2のブロープ中に2つの隣接する不對塩基が存在すると、そのプロモーターから生成される核酸の量が増加するが、3つの不對塩基が存在すると、そのプロモーターから合成される核酸の量が、さらに一層増加することを、本発明者らは見出した。

【0029】

これらの態様では、不對塩基が第2のブロープ中にあり、それに対応する不對塩基が関心のある配列中にある（すなわち塩基ミスマッチがある）場合がある。また塩基は、それらが関心のある配列のうちの（ループとして存在する）無関係な塩基からなる部分と相対しているために、対になっていない場合もある。逆に、不對塩基が関心のある配列中に存在して、第2のブロープが無関係な塩基のループを含む場合もある。第2のブロープおよび/または標的配列中の不對塩基の数を左右する（増加または減少させる）関心のある配列からの変異は、理論的にはいずれも検出できるだろう。ただし上述のように、変異型配列と関心のある配列との相違が一塩基によるものである場合は、不對塩基の数の1から2への（逆

も同じ)または2から3への(逆も同じ)変化が、最も大きい区別を与えるようである。変異型塩基の数がさらに多い場合は、より容易に検出されるだろう。

【0030】

第3の側面として本発明は、第1の側面に従う一対のプロープと適当な包装手段とを含んでなる、関心のある核酸標的配列の存在を検出するためのキットを提供する。本キットは通例、本発明の第2の側面の方法を実施するために使用され、その方法を実施するための説明書を含むと便利である。本キットは次の1つまたはそれ以上を含むと好都合である: DNAおよび/またはRNAポリメラーゼ、標識用試薬類、ヌクレオチド三リン酸類(標識されたもの、またはそうでないもの)、検出試薬類(例えば酵素、分子ビーコン)および緩衝液類。

【0031】

不安定化部分は、一般に、核酸の相補鎖がハイブリッド形成した状態になる時に通常起こるような普通の様式では塩基対形成と水素結合を起こすことができない化学物質である。本発明では、その不安定化部分が、2つのプロープの会合によって形成せられる二本鎖の融解温度(T_m)を効果的に低下させて、第3の核酸分子(標的)の存在下にそれらの分子が熱力学的にはるかに安定な三元接合部を形成できるようにする。それゆえ、不安定化部分の存在は、比較的不安定なプロープ二本鎖よりも三元接合部の方を、熱力学的に有利にする。次に、会合したプロープの増幅は、基本的にWO 93/06240 (Cytocell社)に記述されているように達成できる。あらゆる種類の分子が不安定化部分としての使用に好適でありうるが、以下に説明するように一部の化合物はとりわけ好ましい。本明細書を利用すれば、当業者は他の化合物を試験して、関心のある標的核酸の不在下でのプロープのハイブリッド形成が防止されるように、適度な不安定化を与えるものを、容易に選択できるだろう。従来の自動固相核酸合成機を使った合成オリゴヌクレオチドへの組み込みを容易にする形で(例えばホスホロアミダイトとして)市販されているものが、便宜上とりわけ好ましい。

【0032】

オリゴヌクレオチドに非ヌクレオチドセグメントを導入するには、リンカーまたはスパーサー分子が使用されてきた。これらの分子は、適当な結合が可能でな

い場合に折り目とヘアピンを形成させてオリゴヌクレオチドの断片を橋渡しするために、また単に標識をオリゴヌクレオチドからさらに遠くに離すためだけに使用されてきた。種々のそのようなスパーサー分子が入手可能であり、それらの多くは本発明での不安定化部分としての使用に好適かもしれない。当業者は、この開示を利用して、そのような適性を容易に確認できるだろう。

【0033】

好ましい態様として、第1のプロープは、関心のある配列に相補的な部分（「配列特異領域」または「脚（foot）」）が一般に10塩基以上であり、関心のある配列に非相補的な部分（「アーム領域」）が一般に5塩基以上であるようなものである。一般に、第1のプロープの場合は、標的特異領域がアーム領域より長いだろう。

【0034】

第2のプロープは、やはり ≥ 10 塩基が好都合な標的特異的な脚領域と、 ≥ 20 塩基が好都合なアーム領域とを持つ。一般に、第2のプロープのアーム領域は、第2のプロープのアーム領域が「突出部」を形成して、それが、例えばW093/06240に記述するように、リボ-またはデオキシリボ-ヌクレオチド三リン酸の存在下に、酵素による第1プロープの伸長のための鋳型として作用できるように、第1のプロープの相補的アーム領域より長いだろう。したがって好ましい態様として、第1のプロープのアーム領域の3'末端は望ましくは3'OHを持ち、そこから第2のプロープのアーム領域を鋳型とする伸長を企てることができる。この伸長を実施するために使用されるポリメラーゼは、熱的反応を望むか等温反応を望むかに依存するだろう。好ましくは、第2のプロープの3'末端は、それがDNAまたはRNAからなる場合は、鎖伸長を防止するためにブロックすべきである。これがどのようにして達成できるかは、例えば3'-ホスフェート、3'-プロピルまたは3'-ジデオキシヌクレオチドの使用など、当業者には明白だろう。不安定化部分は通例、標的特異領域とアーム領域の間に置かれ、第1のプロープおよび/または第2のプロープ中に存在しうる。望ましくは、不安定化部分は第2のプロープ中に存在する。一定の応用例では、不安定化配列が（上記に加えて、またはその代わりに）第1のプロープのアーム中に存在することが望まし

いこともある。いくつかの態様では、一方のプロープにある不安定化部分が標的分子の一部に部分的に相対して置かれてもよいが、通常、これは避けるべきである。

【0035】

不安定化部分の効果には、(a) 標的の不在下での伸長プライマーと鋳型プライマーの間のハイブリッド形成を不安定化することによるバックグラウンドの減少；(b) 改善されたバックグラウンドの抑制による標的依存性の増加；および(c) 三元接合部での立体的圧迫の解除と、それによるポリメラーゼの接近の補助がある。塩基対形成はできないが、それでも柔軟な折り目および/またはヘアピン構造を形成できる不安定化部分はとりわけ好適である。そのような好ましい不安定化部分の一つは、単独で、または最高 n 回 (n は ≥ 1 の任意の数字をあらわしうが、最大値は5であることが好都合である) まで直列に存在しうるヘキサエチレングリコール (ここでは「Hex」と略記する) (図2参照) からなる。特に好ましい態様では、第2のプロープのアーム領域が直列に並んだ2つのHex分子を含んでなり、第1のプロープのアーム領域中でその不安定化部分と相対する塩基の数は6ないし8 (最も好ましくは6) 塩基が望ましく、その後ろに好ましくは5~15塩基の相補領域が続く。これに代わるもう一つの好ましい不安定化部分は、複数のアルキレン (とりわけメチレン) 反復からなる。ペンターまたはヘキサメチレンスパーサーがとりわけ好ましい。

【0036】

これらに代えて他のそれほどには好ましくない不安定化部分も使用できる。それらにはイノシン、Virazole™ (N[1]—[1-β-D-リボフラノシル]-3-カルボキサミド-1,2,4-トリアゾール)、Nebularin™ (N[9]—[1-β-D-リボフラノシル]-プリン)、ニトロピロール、リボース、プロピルまたは上記の組み合わせ、例えばプロピル-Hex-プロピル、プロピル-Hex-Hex-プロピルなどがあるが、これらに限るわけではない。プロピルは例えばエチル、ブチル、ペンチル、ヘプチル、オクチルなどで置き換えてもよい。相互のプロープのアーム領域内でその不安定化部分と相対する塩基の数は x (ここに x は ≥ 1) であることが望ましい。塩基の正確な数は、もちろん、不安定化部分のサイズと n の

値に依存するだろう。

【0037】

次の記述は指針として使用できる：不安定化部分中の各Hex分子については、それと相対するオリゴヌクレオチドは好ましくは3～4（好ましくは3）塩基からなるべきである；不安定化部分に存在する上述の他の分子または基のそれぞれについては、それと相対するオリゴヌクレオチドは、次の例外を除いて、好ましくは一塩基からなるべきである：プチルー2塩基、ベンチルー2塩基、ヘプチルー3塩基およびオクチルー4塩基。

【0038】

不安定化部分として使用される上述の化学物質はすべて（例えば米国Glen Research社から）市販されている。

【0039】

本発明のさらにもう一つの態様として、二本鎖DNA（ゲノムDNAなど）を含む混合物中の関心のある配列を検出したい場合は、そのハイブリダイゼーション混合物に、さらなるオリゴヌクレオチド（「ブロッキングオリゴヌクレオチド」）を含めることが有利だろう。これらのブロッキングオリゴヌクレオチドは、第1のプローブに相補的な部分と第2のプローブに相補的な部分のそれぞれの側で、関心のある配列にハイブリッド形成する。ブロッキングオリゴヌクレオチドはDNA、PNA、LNA（またはそれらの組み合わせ）からなることが好ましく、それぞれ少なくとも10（より好ましくは少なくとも20）ヌクレオチドからなることが有利である。ブロッキングオリゴヌクレオチドの目的は、（使用するハイブリッド形成条件下に）標的鎖のその相補鎖との再アニールを抑制することである。ブロッキングオリゴヌクレオチドは第1および第2のプローブに実質的に隣接して標的鎖にアニールしてもよいし、そこから少し（例えば5～50塩基）離れたところアニールしてもよい。

【0040】

ブロッキングオリゴヌクレオチドは、第1および/または第2のプローブが大きな標的相補「脚(feet)」領域を含有する場合には、ほとんど利点がないかもしれない。

【0041】

上述のように、本発明による三元接合部の形成は、通例、核酸（通常はRNA）の新規合成をもたらすだろう。新たに合成された核酸は、好ましくは増幅工程に続いて、いくつかの技術のいずれでも直接または間接的に検出できる。好適な検出および増幅工程をさらに詳しく以下に説明する。

検出方法

本発明の方法に従って三元接合部から生成された核酸は、好ましくは増幅（最も好ましくは等温増幅段階を使った増幅）に続いて、いくつかの方法で検出できるだろう。例えば、新たに合成されたRNAは、合成中に標識塩基を組み込んで、または組み込まないで、従来の方法で（例えばゲル電気泳動によって）検出できるだろう。

【0042】

もう一つの選択肢として、例えば新たに合成されたRNAを固体表面（例えばビーズ上や、マイクロタイタープレート中）に捕捉し、捕捉された分子を標識核酸プローブ（例えば放射標識したもの、またより好ましくは、酵素、発色団、蛍光体などで標識したもの）とのハイブリッド形成で検出することができるだろう。

【0043】

一つの好ましい検出法では、分子ビーコンや、蛍光共鳴エネルギー移動（「FRET」）、遅延蛍光エネルギー移動（「DEFRET」）または均一時間分解蛍光（「HTRF」）の技術を使用する。分子ビーコンは、その分子のコンフォメーションに依存して蛍光シグナルを生成したり生成しなかったりする分子である。通例、その分子の一部分が蛍光体を含み、その分子のもう一つの部分がその蛍光体から生じる蛍光を消光するための「消光体」を含む。したがって、その分子のコンフォメーションが、蛍光体と消光体とが極めて接近するようなものである場合は、その分子ビーコンは蛍光を発しないが、蛍光体と消光体が比較的速く分離されている場合は、その分子は蛍光を発する。分子ビーコンは適当な蛍光体と消光体で標識された核酸分子からなることが好都合である。

【0044】

分子ビーコンのコンフォメーションを変化させる方法の一つは、核酸へのハイ

ブリッド形成によるものであり、例えば分子ビーコンの一部のルーピングアウトを誘発することによる。もう一つの選択肢として、分子ビーコンが最初はヘアピン型構造（自己相補の塩基対形成によって安定化されたもの）をとり、その構造をハイブリッド形成によって、または酵素もしくはリボザイムによる切断によって変化させてもよい。

【0045】

FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）は蛍光供与体分子が無放射双極子-双極子相互作用によって受容体分子にエネルギーを移動するときに起こる。供与体と受容体間の距離 R に依存するエネルギー移動が起こると、供与体の寿命と量子収率は低下し、受容体蛍光は増加または増感する。

【0046】

本発明者らは、核酸ハイブリッド形成アッセイでの供与体および受容体として、FAM（6-カルボキシフルオレセイン）とTAMRA（N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン）を使用した。このアッセイでは2つの色素標識DNAオリゴマー（15マー）を使用した。FAMを一方のプロープの5'に連結し、TAMRAを他方の3'に連結した。標的核酸にハイブリッド形成すると、それらのプロープは互いに隣接して配置され、FRETが起こりうる。本発明者らの実験により、最大のシグナルを得るにはプロープの間に5塩基の間隔をおく必要があることが実証された。DEFRETとHTRF（後述）に最適な間隔はこれとは異なりうる（これより短いことが多い）。

【0047】

もう一つの方法（DEFRET、遅延蛍光エネルギー移動）は、励起状態に励起された時に効率のよい長寿命放射（ λ （励起）=337nm、 λ （放射）=620nm）を示すことができる一定の金属イオン（ランタニド、例えばユウロピウム）のユニークな特性を利用している。そのような長寿命放射の利点は、放射の測定を初期中断後に始めることにより、全てのバックグラウンド蛍光と光散乱を散逸させる時間分解（TR）技術を使用できる点である。CY5（ λ （励起）=620nm、 λ （放射）=665nm）はDEFRETパートナーとして使用できる。

【0048】

HTRF (WO 92/01224 および US 5,534,622) は、供与体 (ユウロピウム) を保護ケージ (クリプテート) に包接し、オリゴマーの 5' 末端に取り付けた場合に起こる。この系のために開発された受容体分子は XL 665 と呼ばれるタンパク質蛍光体である。この分子を第 2 のプローブの 3' 末端に連結する。この系は Packard によって開発されたものである。

【0049】

もう一つの態様では、新たに合成された RNA が、増幅前または増幅後に、特定の核酸基質配列の切断 (例えば蛍光体/消光体標識オリゴヌクレオチドの切断) によって検出できるリボザイムの形成をもたらす。

増幅技術

本発明の好ましい態様では、標的依存的転写反応に由来する RNA が検出に先立って増幅され、その増幅段階には通例 DNA オリゴヌクレオチドの導入が必要である。この増幅段階は等温的に (すなわち PCR を実施する際に必要な類の熱サイクリングを必要としないで) 達成することが有利である。導入される DNA オリゴヌクレオチドは、新たに合成された RNA の 3' 領域に相補的であり、RNA ポリメラーゼプロモーターの配列とユニークな転写可能配列 (鋳型部分) も含有する。新たに合成された RNA をその DNA オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させると、添加した DNA ポリメラーゼによって媒介されるその RNA の 3' 末端からのプライマー伸長反応が、機能的な二本鎖 RNA ポリメラーゼプロモーターを生成させる。適切な RNA ポリメラーゼの存在下で、多数コピーの第 2 の RNA 種がその DNA オリゴヌクレオチドのユニーク領域から合成される。次にこの RNA は、さらなるプライマー伸長と RNA 合成にとつてのプライマーとして作用できる。さらなる RNA の合成には、第 2 の RNA 種の 3' 領域に相補的なもう一つの DNA オリゴヌクレオチドの存在が必要である。この DNA オリゴヌクレオチドは、RNA ポリメラーゼプロモーター要素の配列と、転写された時に標的依存的な転写反応で生じるものと同じ RNA を生成させる配列も含有する。このようにして合成された RNA の 3' 末端は第 1 の DNA オリゴヌクレオチドに相補的であり、それゆえにサイクル型の増幅系が生成する。

【0050】

上述の態様の一変法では、導入された DNA オリゴヌクレオチドが新規合成され

たRNAにハイブリッド形成し、それぞれの配列は、新たなRNAポリメラーゼプロモーターがDNAポリメラーゼによる伸長段階を必要としないで直接形成されるようになっている。次に、サイクリング反応は基本的に上述と同様に実施でき、一つの反応で生じた転写物がDNAオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成して第2のRNAプロモーターを形成し、それが元の転写物と同じ配列を持つ転写物を生成させる。

【0051】

多くのRNAポリメラーゼは（比較的低い頻度で）一本鎖DNA配列のRNA転写物を生成させる傾向をもち、そのために例えば、適切な相補鎖が存在しなくても一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの転写がいくらか起こりうるので、上述の増幅法では、多少のバックグラウンド「ノイズ」が生成するかもしれない。この低レベルのバックグラウンド転写は、転写の終結を引き起こす傾向がある配列をその3'末端近くに含むようにDNAオリゴヌクレオチドを設計することによって、低下させることが可能である。T7ポリメラーゼによる転写をとりわけ有効に終結させるそのような配列の一例は、Heら（1998 J. Biol. Chem. 273, 18, 802）によって開示されているように、AACAGAT（鋳型鎖）である。同じまたは類似の終結配列をDNA鋳型の5'末端に配置して、連続移動性を向上させることもできるだろう。

【0052】

以下に、実施例を挙げ、添付の図面を参照して、本発明をさらに詳しく説明する。

【0053】

図1では、第1のプロープ（4）と第2のプロープ（6）への標的配列（2）のハイブリッド形成によって、三元接合部が形成される。第1のプロープ（4）は、標的配列（2）に相補的な「標的特異領域」（8）と、「アーム領域」を構成する標的配列に非相補的な部分（10）とを含む。第2のプロープ（6）も、標的の中の第1のプロープ（4）にハイブリッド形成する部分とは異なるがそれを実質的に隣接する標的（2）の一部に相補的な標的特異配列（12）を含む。第2のプロープはアーム領域（14）を含む。アーム領域（14）は、標的特異

領域(12)とアーム領域(14)の残りの部分の間に位置する不安定化部分(参照番号(16)で示す)を含む。アーム領域(14)は、第1のプロープのアーム領域(10)に相補的な領域(18)(5~15塩基)も含む。領域(18)に隣接して5'突出領域(20)があり、これはリボースまたはデオキシリボースヌクレオチド三リン酸と適当なポリメラーゼの存在下に、第1のプロープのアーム領域(10)の3'末端の伸長によつての鋳型として働かざる。「突出」または「鋳型」領域(20)は任意の適当な配列からなりうる。

【0054】

例えば、増幅がPCRまたは熱サイクリングによつて達成される場合、事実上どの配列でも好適でありうる。しかし、増幅が(一般に好ましいように)等温サイクリングで達成される場合は、鋳型領域が1つ以上のRNAポリメラーゼプロモーターの鋳型領域を含み、さらに典型的にはその効率を最適化するためにそのプロモーターに隣接した+12領域を含み、また転写された時にその転写物のさらなる増幅、捕捉および/または検出を容易にする配列を含むことが好都合である。

実施例

実施例1

この実施例では、B型肝炎ゲノムのある領域に特異的なプロープの相互作用の結果として起こる新規核酸の合成を実証する。標的(プロープ3)への第1および第2のオリゴヌクレオチドプロープのハイブリッド形成は、三元接合部の形成をもたらす。第1のプロープは2つの領域、すなわち標的特異領域とアーム領域からなる。第2のプロープも2つの領域、すなわち標的のうちの第1のプロープの標的特異領域とは異なる部分に相補的な標的特異領域と、第1のプロープのアーム領域の一部に相補的なアーム領域からなる。第2のプロープのアーム領域は、直列に組み込まれた2つのヘキサエチレングリコール(Hex)分子も含有する。第1プロープのアーム領域にはそれら2つのHex分子に相対する6つの塩基があり、それらはHexに相対して非相補ループを形成する。第1および第2のプロープのうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによつて認識される9塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのプロープ伸長を引き起こして、新たに合成された核酸を生成させる。そのアッセイ混

合物は、核酸合成を増幅し増進するために、さらなるプローブ（プローブ4）を含有する。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプローブは全て、Applied Biosystems社製380A合成機を製造者の指示に従って使用することにより、ホスホロアミダイト法によって合成した。Hexの組み込みは、成長中の鎖の18-ジメトキシトリチルヘキサエチレングリコール、1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]ホスホロアミダイトとの反応によって達成した。オリゴヌクレオチドプローブのビオチン化は、ビオチンホスホロアミダイトの組み込みによって達成した。アルカリホスファターゼで官能化されたオリゴヌクレオチドは、製造者の特許方法（Oswel社）を使って調製した。オリゴヌクレオチドは全て標準的技術を使ってHPLC精製した。

ハイブリッド形成され伸長されたオリゴヌクレオチドの増幅

ハイブリッド形成は、2.5mM MgCl₂、0.2mMの各dNTP（2'-デオキシアデノシン5'-三リン酸（dATP）、2'-デオキシチミジン5'-三リン酸（dTTP）、2'-デオキシグアノシン5'-三リン酸（dGTP）および2'-デオキシシチジン5'-三リン酸（dCTP））を含む16mM (NH₄)₂SO₄、6.7mM Tris-HCl pH 8.8および0.01% Tween-20中に20.0pmolの第1プローブ、0.2pmolの第2プローブ、7.5pmolのプローブ3（B型肝炎標的）および10.0pmolのプローブ4（増幅プローブ）を含有する50μlのアッセイ混合物中で達成した。伸長と増幅は4単位のExo（-）Polythermase™（BioLine社）DNAポリメラーゼで行なった。ストレプトアビジン被覆プレートでの捕捉が可能のように、第1のプローブまたはプローブ4をその5'末端でビオチン化した。そのアッセイ混合物を95℃に2分間加熱した後、95℃で20秒間、次いで45℃で15秒間の熱サイクリングを、測定可能なシグナルを生成させるのに必要なサイクル数だけ行なった。バックグラウンド値を標的プローブの不在下でのサイクリングについて決定した。

増幅された伸長されたプローブの捕捉と検出

アッセイ混合物の一部（1~50μl）を、130μlの50mM Tris-HCl pH

8.0、138mM NaCl、2.7mM KCl+0.1% BSAを含む96穴ストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレート (Labsystems社) のウェルに移した。そのプレートを室温で最低30分間振とうし、138mM NaCl、2.7mM KClを含む50mM Tris-HCl pH 8.0+0.1% Tween-20 (TBS/Tween-20) で1回洗浄した。次に、180 μ lの150mM NaOH/0.05% Tween-20をウェルに添加し、振とうしながら室温で5分間インキュベートした。そのウェルをTBS/Tween-20で4回洗浄した。50mM Tris-HCl pH 8.0、1M NaCl、20mM EDTA、0.1% Tween-20および0.1% BSAを含有するハイブリダイゼーション緩衝液中、アルカリホスファターゼ標識オリゴヌクレオチド (プローブ5) を、第1のプローブまたはプローブ4より1.2倍高い濃度で加えた。そのプレートを振とうしながら室温で1時間インキュベートし、TBS/Tween-20で4回洗浄した後、アルカリホスファターゼ基質緩衝液 (Boehringer Mannheim社) で1回洗浄した。最後に、4-ニトロフェニルホスフェート (5mg/ml) を含有するアルカリホスファターゼ基質緩衝液を各ウェルに加え、Labsystems社製EIAプレートリーダー中、37℃で30分間インキュベートし、表示値を405nmで読み取った。

【0055】

その結果 (簡略のためデータは省いた) は、標的の不在下では極めてわずかなバックグラウンドシグナルが得られるが、標的配列が存在すると極めて強いシグナルが得られることを示した。

代替検出系

もう一つの選択肢として、ユロピウム標識プローブ5 (E686 Wallac社、英国ミルトンキーンズ) を、励起フィルター (340nm) および放射フィルター (615nm) とWallac Victor 1420マルチチャンネルカウンタを用いる時間分解蛍光検出に使用できるだろう。

オリゴヌクレオチドの一覧 (HはHexを表す)

第1のプローブ

5'GCTCAGTTTACTAGTGCCATTGTTCGCCACGGCGGCGAG3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号11)

第2のプローブ

5' GGATATCACCCGATGTGCGGCGCTCCGCCGCHAGTGTTCTGTAGGGCTTTCCCCACTGTTーリン酸3' (配列番号12)

プローブ3 (B型肝炎ゲノムの標的領域)

5' AACTGAAAGCCAAACAGTGGGGGAAAGCCCTACGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAACTGAGCCA GG3' (配列番号13)

プローブ4

5' GGATATCACCCGATGTG3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号14)

プローブ5

5' TACTAGTGCCATTTG3' (アルカリホスファターゼまたはユウロビウム標識されたもの) (配列番号15)

実施例2

今度はヒト4番および18番染色体アルフォイド反復単位を標的として使用し、プローブ配列をそれに応じて変更して、基本的に実施例1の方法を繰返した。増幅段階は、95℃で20秒間の後55℃で5秒間という条件を用いて熱サイクリングを行なった点で、わずかに異なった。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプローブ

5' AAACAGAAGCATTCTCAGAACTTCTCAGTGATGGCCACGCGGCGAG (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号16)

第2のプローブ

5' GGATATCACCCGATGTGCGGCGCTCCGCCGCHHTTTGCATTAGCTCATGGAGTTGAACACTTCCーリン酸3' (配列番号17)

プローブ3 (ヒト4番および18番染色体アルフォイド反復単位の領域)

5' CTATGAAAGGAAGTGTCAACTCCATGAGCTGAATGCAACATCACTGAGAAGTTTCTGAGAATGCTTCTGTTTGATTTT3' (配列番号18)

プローブ4

5' GGATATCACCCGATGTG3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号14)

プローブ5

5' AAACCTCTCAGTGAT 3' (アルカリホスファターゼ標識されたもの) (配列番号19)

得られた結果を図3に示す。この図は、必要な試薬が全て存在している測定用試料の(405nmでの)吸光度(左側)を、標的配列を欠く対照試料(中央)またはブランク試料(右側)と比較して示した棒グラフである。

実施例3

今度はヒト囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)配列を標的にし、プローブ配列をそれに応じて変更して、基本的に実施例1の方法を繰返した。ハイブリッド形成条件は、50 μ lのハイブリダイゼーション混合物が2.5pmolの第1プローブ、1.0pmolの第2プローブ、7.5pmolのプローブ3(標的)および2.0pmolのプローブ4を含有する点で、わずかに変更された。増幅は95℃で20秒間と60℃で5秒間の熱サイクリング条件を用いて行なった。

他の検出系

ユウロビウム標識プローブ5 (EG&G Wallac社)を、励起フィルター(340nm)および放射フィルター(615nm)とWallac Victor 1420マルチラベルカウンターを用いる時間分解蛍光検出に使用できるだろう。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプローブ

5' TGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGCCACCCGGCGGAG 3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号20)

第2のプローブ

5' GGATATCACCCGATGTGCGGCGCTCCGCGHHGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCG—リン酸 3' (配列番号21)

プローブ3 (ヒトCFTR遺伝子の領域)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG 3' (配列番号22)

プローブ4

5' GGATATCACCCGATGTG 3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号14)

)

ブロープ5

5' TTAAGAAAATATCA 3' (アルカリフォスファターゼまたはユロビウム標識されたもの) (配列番号23)

得られた結果を図4に示す。この図は、必要な試薬を全て含有する測定用試料の405nmでの吸光度(左側)を、標的を欠く対照試料(中央)またはブランク試料(右側)と比較して示した棒グラフである。

実施例4

基本的に実施例3の方法を繰返したが、この実施例では第2のブロープが、不安定化部分として配列中に組み込まれた2つのプロピル基(Pr)、2つのヘキサエチレングリコール(Hex)分子および2つのさらなるプロピル基(Pr)を含有した。

オリゴヌクレオチドの調製

プロピルの組み込みはジメトキシトリチル化プロピルホスホロアミダイトを使って行なった。その他の場合は、先の実施例に記述したようにブロープを合成し、精製した。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のブロープ

5' GATTATGCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGCCACCCGGCGGAG 3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号24)

第2のブロープ (H=Hex, P=プロピル)

5' GGATATCACCCGATGTGCGGCGCTCCGCCGGPPHPPGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCG-リン酸 3' (配列番号25)

ブロープ3 (ヒトCFTR遺伝子の領域)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG 3' (配列番号22)

ブロープ4

5' GGATATCACCCGATGTG 3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号14)

)

プローブ5

5' TTAAGAAAATCA 3' (アルカリホスファターゼまたはエウロビウム標識されたもの) (配列番号23)

ハイブリッド形成され伸長されたオリゴヌクレオチドの増幅

ハイブリッド形成は実施例3に記述したような条件を用いて行なった。伸長と増幅は先に記述したように、ただし95℃で20秒間の後60℃で5秒間という熱サイクリングで、行なった。

【0056】

増幅された伸長されたプローブの捕捉と検出は先の実施例に記述したように行なった。

【0057】

得られた結果を図5に示す。この図は、必要な試薬が全て存在している測定用試料の(405nmでの)吸光度(左側)を、標的配列を欠く対照試料(中央)またはブランク試料(右側)と比較して示した棒グラフである。濃度既知の試料を用いた結果から得られる標準曲線から、RNAの定量を達成できる。

実施例5

この実施例では、ヒト囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)遺伝子用のプローブの相互作用の結果として起こる新規核酸の合成を実証する。

【0058】

この実施例では、標的への第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブのハイブリッド形成が、三元接合部の形成をもたらす。第1のプローブのアーム領域は、不安定化部分として直列に組み込まれた2つのヘキサエチレングリコール(Hex)分子を含有する。第2のプローブのアーム領域にはその2つのHex分子と相対する6個の塩基があり、それらはHexに相対して非相補ループを形成する。第1と第2のプローブのうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによって認識される10塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのプローブ伸長を引き起こす。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプローブはすべて先の実施例に記述したように合成し、精

製した。

ハイブリッド形成させ伸長させたオリゴヌクレオチドの増幅

ハイブリッド形成は先の実施例に記述したように、ただし5.0pmolの第1プローブ、0.05pmolの第2プローブおよび7.5pmolのプローブ3（標的）を使用して達成した。伸長は4単位のExo（-）Polythermase™（BioLine社）DNAポリメラーゼで行なった。ストレプトアビジン被覆プレートでの捕捉が可能のように、第1プローブをその5'末端でビオチン化した。そのアッセイ混合物を95℃に2分間加熱した後、95℃で20秒間、次いで60℃で5秒間の熱サイクリングを、測定可能なシグナルを生成させるのに必要なサイクル数だけ行なった。バックグラウンド値を標的のプローブの不在下でのサイクリングについて決定した。伸長されたプローブの捕捉と検出

アッセイ混合物のうち20μlを、130μlの50mM Tris-HCl pH 8.0、138mM NaCl、2.7mM KCl+0.1% BSAを含んでいる96穴ストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレート（Labsystems社）のウェルに移した。そのプレートを室温で最低30分間振とうした。次にそれらのウェルを、138mM NaCl、2.7mM KClを含む50mM Tris-HCl pH 8.0+0.1% Tween-20（TBS/Tween-20）で4回洗浄した。抗Digフルオレセイン標識抗体（Sigma-Aldrich社）を1×STM（20×SSC、0.25% Tween-20、20% 脱脂粉乳、0.1% アジ化ナトリウム）に1:10,000希釈し、150μlの抗体コンジュゲートを各ウェルに添加してから、37℃で15分間インキュベートした。それらのウェルをTBS/Tween-20で4回洗浄した。ヒツジ抗フルオレセインアルカリホスファターゼ（Boehringer Mannheim社）を1×STMに1:5,000希釈し、150μlを各ウェルに添加してから、37℃で15分間インキュベートした。次に、それらのウェルをTBS/Tween-20で4回洗浄した後、アルカリホスファターゼ基質緩衝液（Boehringer Mannheim社）で1回洗浄した。最後に、4-ニトロフェニルホスフェート（5mg/ml）を含有するアルカリホスファターゼ基質緩衝液を各ウェルに添加し、37℃で30分間インキュベートした。次にそのプレートをLabsystems社製EIAプレートリーダー中、405nmで読み取った。

【0059】

得られた結果を図6に示す。この図は、必要な試薬が全て存在している測定用試料の(405nmでの)吸光度(左側)を、標的配列を欠く対照試料(中央)またはブランク試料(右側)と比較して示した棒グラフである。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプロープ

5'GGCACCATTAAAGAAAATATCATCTHHCCACCCGGCG3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号26)

第2のプロープ

5'GGATATCACCCGGCGGTCGTCGTGGTTTTGCGTGCGGCGCTCCGCCGGGTGGCGGTGTTCTCTATGATGAATATAGATACAGAAGCG-リン酸3' (配列番号27)

プロープ3 (ヒトCFTR遺伝子の領域)

5'GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG3' (配列番号22)

プロープ4

5'GGATATCACCCG3' (アルカリホスファターゼ標識されたもの) (配列番号28)

実施例6

この実施例では、遺伝子用のPNA:DNAキメラプロープの相互作用の結果として起こる新規リボ核酸の合成を実証する。

【0060】

標的(プロープ3)への第1および第2のプロープのハイブリッド形成は、三元接合部の形成をもたらす。第1のプロープは2つの領域、すなわちPNAからなる標的特異領域とDNAアーム領域からなり、それらは適切なC5またはC6リンカー分子(この例では5または6個のメチレン反復)で隔てられている。このリンカーは、このプロープのPNA部分とDNA部分の間の柔軟性を増大させるのに役立つ。第2のプロープもC5またはC6リンカーで隔てられた2つの領域、すなわち標的特異的なPNA領域と、第1のプロープのアーム領域に一部が相補的なアーム領域からなる。第2のプロープのアーム領域はT7 RNAポリメラーゼプロモーター配列と、生成物の捕捉および検出用の配列も含有する。第1および第2のプロ-

ブのうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによって認識される7塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのブローブ伸長を引き起こす。伸長により、DNA依存性RNAポリメラーゼによって認識される二本鎖の機能的プロモーター配列が生成し、RNAの標的依存的合成が起こる。

オリゴヌクレオチドの調製

PNAは、カルボキシおよびアミノ官能化された基を標準的条件下でカップリングすることによって形成される。PNA:DNAキメラは、C5またはC6 リンカー（メチレン残基の繰り返し単位からなる）を介して形成される。オリゴヌクレオチドブローブのビオチン化は、ビオチンホスホロアミダイトの組み込みによって達成される。その他の場合、ブローブは先の実施例に記述したように合成し、精製した。

ハイブリッド形成させたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成は、0.6 pmolの第1ブローブ、50 fmolの第2ブローブおよび0.5 pmolのブローブ3（CFTR遺伝子の標的）をT7 RNAポリメラーゼ緩衝液（最終濃度で40 mM Tris-HCl, pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 2 mM スペルミジン, 10 mM NaCl）と共に含むアッセイ混合物中で達成される。RNアーゼフリー蒸留水で反応液量を20 μ lにする（後の酵素とNTP類の添加に備える）。対照反応は第1および第2のブローブを含むが標的（ブローブ3）を含まない。その混合物を90℃に3分間加熱して核酸を変性させ、氷上で冷却し、37℃に平衡させた。DNAポリメラーゼIのクレノウ断片（3'→5' exo (-) ~2.5単位）と1 μ lのdNTP混合物（10 mMの各dNTP: 2'-デオキシアデノシン5'-三リン酸（dATP）、2'-デオキシチミジン5'-三リン酸（dTTP）、2'-デオキシグアノシン5'-三リン酸（dGTP）および2'-デオキシシチジン5'-三リン酸（dCTP））を加え、その混合物を37℃で30分間インキュベートして、第1のブローブの伸長によって機能的なT7 RNAポリメラーゼプロモーターを生成させる。T7 RNAポリメラーゼ（40単位）と2 μ lのNTP混合物（20 mMの各NTP: アデノシン5'-三リン酸（ATP）、グアノシン5'-三リン酸（GTP）、シチジン5'-三リン酸（CTP）、ウリジン5'-三リン酸（UTP））を加え、その反応液を37℃でさらに180分間インキュベートした後、転写されたRNAの検出を行なった。

合成されたRNAの捕捉と検出

RNアーゼフリーDNアーゼ（アッセイ混合物10 μ lにつき1.6単位のDNアーゼを添加し、37℃で15分間インキュベート）を使って、DNA（第1および第2のプロープの一部とプロープ3）をアッセイ混合物から除去する。処理したアッセイ試料の各5 μ lを1対ずつ、ストレプトアビジン被覆ウェル中の、0.9 pmolのプロープ4（特異的なビオチン化捕捉オリゴヌクレオチド）と1.2 pmolのプロープ5（特異的なアルカリホスファターゼ官能化オリゴヌクレオチド）とを含有する145 μ lのハイブリダイゼーション緩衝液（50 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 M NaCl、20 mM EDTAおよび0.1 %BSA）に加えた。インキュベーション（300 rpmで振とうしながら室温で60分間）により、そのRNAを、ビオチン化捕捉プロープを介してウェルに固定化させ、検出プロープにアニールさせる。TB5/0、1 %Tween-20で4回洗浄した後、アルカリホスファターゼ基質緩衝液（Boehringer Mannheim社）で1回洗浄することにより、未結合の物質を除去する。最後に、4-ニトロフェニルホスフェート（5 mg/ml）を含有するアルカリホスファターゼ基質緩衝液を各ウェルに添加する。そのプレートと、Labsystems社製EIAプレートリーダー中、37℃でインキュベートし、2分置きに405 nmでの表示値を読み取る。

【0061】

上述のように、代替検出系では、励起フィルター（340 nm）および放射フィルター（615 nm）とWallac Victor 1420マルチラベルカウンタを用いる時間分解蛍光検出に、ユウロピウム標識プロープ5（EG&G Wallac社）を使用できるだろう。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプロープ PNAは小文字で示し、DNAは大文字で示す。選択されたリンカー（C5またはC6）を～で示す。

5' aaagaaaatcatcatcttt～CTGAAAT 3'

第2のプロープ（PNAは小文字、DNAは大文字、～＝リンカー）

5' CCTGTCTCCGTCTCGATATCACCCGATGTGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCAAG～ ggtagtttcctatgatg 3'（配列番号29）

プローブ3（ヒトCFTR遺伝子の領域）

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGG
CATAATCCAGG 3'（配列番号22）

プローブ4（捕捉プローブ）

5' TGCCTCCTTGCTCCGTTCT 3'（5'-ビオチン化されたもの）（配列番号30）

プローブ5（検出プローブ）

5' GGATATCACCCG 3'（アルカリホスファターゼまたはユウロビウム標識されたもの）（配列番号28）

実施例7

この実施例では標的を再びCFTR遺伝子とした。第1および第2のプローブはそれぞれのアーム部分に一つのHex残基を含有した。これらのプローブのうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによって認識される10塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのプローブの伸長を引き起こす。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプローブはすべて先の実施例に記述したように合成し、精製した。

ハイブリッド形成させ伸長させたオリゴヌクレオチドの増幅

ハイブリッド形成は実施例5に記述したように行なったが、5.0 pmolの第1プローブ、0.05 pmolの第2プローブおよび7.5 pmolのプローブ3（標的）を含有するハイブリダイゼーション混合物を使用した。伸長と増幅は実施例5に記述したように行なった。伸長されたプローブの捕捉と検出も実質的に実施例5に記述したように行なった。

【0062】

得られた結果を図7に示す。この図は、必要な試薬が全て存在している測定用試料の（405 nmでの）吸光度（左側）を、標的配列を欠く対照試料（中央）またはブランク試料（右側）と比較して示した棒グラフである。これらの結果から、ほとんど同じ量のシグナルが標的を含まない試料によって生成されることが明らかであり、この例では、第1プローブと第2プローブの両方への不安定化部分

の包含が、一つのプロープへの不安定化部分の包含よりも好ましくないことが示唆される。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプロープ

5'GGCACCATTAAAGAAATATCATCTHCCACCCGGCG3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号31)

第2のプロープ

5'GGATATCACCCGATGTGCGGCGCTCCGCCGGGTGGHTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGーリン酸3' (配列番号32)

プロープ3 (ヒトCFTR遺伝子の領域)

5'GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG3' (配列番号22)

プロープ4

5'GGATATCACCCG3' (アルカリホスファターゼ標識されたもの) (配列番号28)

実施例8

この実施例での標的配列はCFTR遺伝子とした。配置は、第2のプロープの標的
非相補アームが、不安定化部分として直列に組み込まれた2つのヘキサエチレン
グリコール (Hex) 分子を含むようなものとした。第1プロープのアームには、
それらのHexに相対して非相補ループを形成する6つの塩基がある。また、プロ
ープ3 (標的) にも、三元接合部の「角」を回って続いているHex二量体からも
たらされる2つの非相補塩基がある。第1および第2のプロープのうち、互いに
相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによって認識さ
れる9塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのプロープの伸長を引き起
こす。このアッセイには、核酸合成を増幅し増進させるために、さらにもう一つ
のプロープ (プロープ4) を使用してもよい。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプロープはすべて先の実施例に記述したように合成し、精製した。

ハイブリッド形成させ伸長させたオリゴヌクレオチドの増幅

ハイブリッド形成、伸長および増幅は実施例3に記述した通りに行なった。増幅された伸長されたプローブの捕捉と検出も実施例3に記述した通りに行なった。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプローブ

5' TTAAAGAAAATATCATCTTTGCCACCCGCGGAG 3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号33)

第2のプローブ

5' GGATATCACCCGATGTGCGCGCTCCGCCGHTGTTTCCTATGATGAATAGATACAGAAGCG—リン酸 3' (配列番号34)

プローブ3 (ヒトCFTR遺伝子の領域)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG 3' (配列番号22)

プローブ4

5' GGATATCACCCGATGTG 3' (5'-ビオチン化される場合がある) (配列番号14)

プローブ5

5' TTAAAGAAAATATCA 3' (アルカリホスファターゼまたはユウロピウム標識されたもの) (配列番号23)

得られた結果を図8に示す。この図は、必要な試薬がすべて存在している測定用試料の(405nmでの)吸光度(左側)を、標的配列を欠く対照試料(中央)またはブランク試料(右側)と比較して示した棒グラフである。

実施例9

この実施例でも標的はCFTR遺伝子の配列に相当するオリゴヌクレオチドとした。この実施例を図9に模式的に図解する。図9に関して、第2のプローブ(6)のアーム(14)は、不安定化部分(16)を構成する直列に組み込まれた2つのヘキサエチレングリコール(Hex)分子、T7 RNAポリメラーゼプロモーター配列(22)(最適なプロモーター活性と連続移動性にとって欠かせない+12

塩基配列を伴っている：Milliganら、1987 *Nucl. Acids Res.* 15, 8783-8798)、生成物の捕捉(26)および検出(24)用の配列を含有した。第1のプロープ(4)のアーム領域(10)にはそれら2つのHex分子に相対する6個の塩基があり、それらはHexに相対して非相補ループを形成する。第1および第2のプロープのうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによって認識される5塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのプロープの伸長を引き起こす。伸長により、DNA依存性RNAポリメラーゼによって認識される二本鎖の機能的プロモーター配列が生成し、それがRNAの合成につながる。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプロープはすべて先の実施例に記述したように合成し、精製した。

ハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成とRNA合成は実施例6に記述した通りに行なった。合成されたRNAの捕捉と検出も実施例6に記述した通りに行なった。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプロープ

5' GCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGCCACGAAAT 3' (配列番号35)

第2のプロープ

5' CCTGTCTCCGTCTCTGGATATCACCCGATGTGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTTCHHGTTGTTT
CCTATGATGAATATAGATACAGAAGCG—リン酸 3' (配列番号36)

プロープ3 (ヒトCFTR遺伝子の領域)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGG
CATAATCCAGG 3' (配列番号22)

プロープ4 (捕捉プロープ)

5' TGCCTCCTGTCTCCGTTCT 3' (5'-ビオチン化されたもの) (配列番号30)

プロープ5 (検出プロープ)

5' GGATATCACCCG 3' (アルカリホスファターゼまたはユウロピウム標識されたもの) (配列番号28)

得られた結果を図10に示す。この図は、必要な試薬がすべて存在している測定用試料の(405nmでの)吸光度(左側)を、標的配列を欠く対照試料(中央)またはブランク試料(右側)と比較して示した棒グラフである。

実施例10 標的中の欠失/挿入によって生じる第1プローブ中の不對塩基

この実施例では、新規リボ核酸の合成が野生型標的と突然変異型標的の識別にどのように利用できるかを示す。選択した標的は野生型CFTR遺伝子配列と、 $\Delta F508$ 突然変異を持つ対応する配列である。2塩基挿入を持つもう一つの標的も一覧に載せる。これらの突然変異は野生型標的で得られるものと比較したときのシグナルの減少によって検出される。この実施例を図11A~11Dに模式的に図解する。

【0063】

図11Aと11Bに関して、野生型標的(2)(プローブ3a)への第1および第2のプローブ(4、6)のハイブリッド形成は三元接合部の形成をもたらす。第1のプローブ(4)の標的特異領域(8)はF508領域を覆っていて、プローブ(4)が欠失を持つ標的(プローブ3c)とハイブリッド形成した時に領域(8)がループを形成するようになっている(図11C)。逆に、挿入を持つ突然変異型標的(プローブ3b)では、標的が三元接合点に2塩基ループを形成する(図11D)。第2のプローブ(6)のアーム領域(14)は、不安定化部分(16)として直列に組み込まれた2つのヘキサエチレングリコール(Hex)分子、T7 RNAポリメラーゼプロモーター配列(22)、生成物の捕捉(26)および検出(24)用の配列を含む。第1のプローブのアーム領域(10)には、それら2つのHex分子に相対する6個の塩基があり、それらはHexに相対して非相補ループを形成する。第1および第2プローブのうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによって認識される5塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのプローブの伸長を引き起こす。伸長により、DNA依存性RNAポリメラーゼによって認識される二本鎖の機能的プロモーター配列が生成し、それがRNAの合成につながる。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプローブはすべて先の実施例に記述したように合成し、精

製した。

ハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成(野生型か突然変異型標的の一つを使用)とRNA合成は実施例6に記述した通りに行なった。合成されたRNAの捕捉と検出も実施例6に記述した通りに行なった。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプロープ

5' GCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGCCACGAAAT 3' (配列番号35)

第2のプロープ

5' CCTTGCTCCGTTCTGGATACACCCGATGTGTCCTATAGTGAGTCGATTAATTTCHGGTGTTT
CCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGーリン酸 3' (配列番号36)

プロープ3a(ヒトCFTR遺伝子の領域ー野生型、508領域に下線)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGG
CATAATCCAGG 3' (配列番号22)

プロープ3b(ヒトCFTR遺伝子の領域ー下線部の2塩基挿入を持つ)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCTTAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCA
GGCATAATCCAGG 3' (配列番号37)

プロープ3c(ヒトCFTR遺伝子の領域ーΔF508突然変異を持つ)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGGCAT
AATCCAGG 3' (配列番号38)

プロープ4(捕捉プロープ)

5' TGCCTCCTTGCTCCGTTCT 3' (5'ービオチン化されたもの) (配列番号30)

プロープ5(検出プロープ)

5' GGATATCACCCG 3' (アルカリホスファターゼまたはユウロビウム標識されたもの) (配列番号28)

図12は上記の実施例から得られた結果を示す棒グラフである。生成したシグナルの量(405nmでの吸光度)は野生型標的配列(左端)が最も高く、2塩基挿入突然変異体(中央左側)と3塩基欠失突然変異体(中央右側)で得られるシグナルの量はそれより少なかった。標的の不在下では極めてわずかなシグナル(

バックグラウンド)しか生成しなかった(右端)。

実施例11 ヒトGP3aエキソン10を用いた塩基突然変異分析

この実施例では、新規リボ核酸の合成が、野生型の標的と塩基突然変異を持つ標的との識別にどのように利用できるかを示す。この系はGP3aエキソン10について363位でのGからAへの単突然変異を検出するように設計されたが、他の標的配列中の塩基突然変異を検出するように適合させることは容易にできるだろう。この実施例を図13A~13Cに模式図的に図解する。

【0064】

図13Aに関して、標的(2)(プローブ3a)への第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブ(4、5)のハイブリッド形成は三元接合部の形成をもたらす。第2のプローブ(6)の標的特異領域(12)は、GP3aエキソン10の363突然変異部位を取り囲む領域にハイブリッド形成する。プローブ(6)のアーム領域(14)は、不安定化部分(16)として直列に組み込まれた2つのヘキサエチレングリコール(Hex)分子、T7 RNAポリメラーゼプロモーター配列(22)、生成物の捕捉(26)および検出(24)用の配列を含む。第1プローブのアーム領域(10)にはそれら2つのHex分子に相対する6個の塩基があり、それらはHexに相対して非相補ループを形成する。第1および第2のプローブ(4、6)のうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによって認識される5塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのプローブの伸長を引き起こす。伸長によって二本鎖の機能的プロモーター配列が生成し、次にそれがDNA依存性RNAポリメラーゼによって認識されて、RNAの合成をもたらす。

【0065】

識別は、野生型標的とハイブリッド形成した時に2塩基ループを形成するように第2のプローブ(6)の標的特異領域を設計することによって達成される(図13B)。GからAへの塩基変異は、突然変異型標的とのハイブリッド形成時に、より大きな3塩基ループアウトが形成されて、シグナルに変化が生じることを意味する(図13C)。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプローブはすべて先の実施例に記述したように合成し、精製した。

ハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成(野生型か突然変異型標的配列を使用)とRNA合成は実施例6に記述した通りに行なった。合成されたRNAの捕捉と検出も実施例6に記述した通りに行なった。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプローブ

5' GGGCTGACCCTCCCGGGGCTGCGCCACGAAAT 3' (配列番号39)

第2のプローブ

5' CCTTGCTCCGTCTGGATATCACCCGATGTGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTATTTCHACTCTCGTCTGCTGGGAGGGCGATAGT-リン酸 3' (配列番号40)

プローブ3a (GP3aエキソン10の領域-野生型、プローブ3bで変化させる塩基の位置に下線)

5' TGAGTGCTCAGAGGAGGACTATCGCCCTTCCCAGCAGGACGAGTGCAGCCCCGGGAGGGTCAGCCCGTCTGCAGCCAGCGGGGCGAGTGCCTCT 3' (配列番号41)

プローブ3b (GP3aエキソン10の領域-6からAへの突然変異の位置に下線)

5' TGAGTGCTCAGAGGAGGACTATCGCCCTTCCCAGCAGGACGAATGCAGCCCCGGGAGGGTCAGCCCGTCTGCAGCCAGCGGGGCGAGTGCCTCT 3' (配列番号42)

プローブ4 (捕捉プローブ)

5' TGCCTCCTTGCTCCGTTCT 3' (5'-ビオチン化されたもの) (配列番号30)

プローブ5 (検出プローブ)

5' GGATATCACCCG 3' (アルカリホスファターゼまたはユウロビウム標識されたもの) (配列番号28)

実施例12 標的中の欠失/挿入によって生じる第2プローブ中の不对塩基

この実施例では、新規リボ核酸の合成が野生型標的と突然変異型標的の識別にどのように利用できるかを示す。選択した標的は、種々の塩基の欠失または変異を持つまたは持たない遺伝子である。この実施例では、それらの突然変異が、野生型標的と与えるものと比較した場合の生成するシグナルの増加によって検出さ

れる。この実施例を図14に模式図的に図解する。

【0066】

図14Aに関して、標的(2)(プローブ3a)への第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブ(4、6)のハイブリッド形成は、第2プローブの脚領域が標的と完全な塩基対形成をしている三元接合部の形成をもたらす(図14B)。第2のプローブ(6)の標的特異領域(12)は、標的(2)の中の2または3塩基欠失を含みうる領域を覆っている。したがってプローブ(6)は、突然変異型標的とハイブリッド形成した時に、2または3塩基のループを形成する(図14C、D)。プローブ(6)のアーム領域(14)は、不安定化部分(16)として直列に組み込まれた2つのヘキサエチレングリコール(Hex)分子、T7 RNAポリメラーゼプロモーター配列(22)、生成物の捕捉(26)および検出(24)用の配列を含む。第1のプローブのアーム領域(10)にはそれら2つのHex分子に相対する6個の塩基があり、それらはHexに相対して非相補ループを形成する。プローブ(4)と(6)のうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによって認識される5塩基対の領域を形成し、それがアッセイ条件でのプローブの伸長を引き起こす。伸長により、DNA依存性RNAポリメラーゼによって認識される二本鎖の機能的プロモーター配列が生成し、それがRNAの合成につながる。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプローブはすべて先の実施例に記述したように合成し、精製した。

ハイブリッド形成させたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成(野生型標的[プローブ3a]か突然変異型標的[プローブ3b~3d]の一つを使用)とRNA合成は実施例6に記述した通りに行なった。合成されたRNAの捕捉と検出は実施例6に記述した通りに行なった。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプローブ(伸長プローブ)

5' GCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGCCACGAAAT 3' (配列番号35)

第2のプローブ(鋳型プローブ)

5' CTTGTCTCCGTTCTGGATATCACCCGATGTGCTCCCTATAGTGAAGTCGTATTAATTTCHGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCG—リン酸 3' (配列番号36)

プローブ3a (ヒトCFTR遺伝子の領域—野生型、他のプローブで欠失または改変される塩基の領域に下線)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG 3' (配列番号22)

プローブ3b (ヒトCFTR遺伝子の領域—↓で示した部位に3塩基欠失を持つ)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAA ↓ CAAGATGATATTTTCTTTAATGGTGCCAGGATAATCCAGG 3' (配列番号43)

プローブ3c (↓で示した部位に2塩基欠失を持つヒトCFTR遺伝子の領域)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCAT ↓ AGGAAACCAAGATGATATTTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG 3' (配列番号44)

プローブ3d (ヒトCFTR遺伝子の領域、プローブ3cとの相違点は、↓で示すCからAへの一塩基変化)

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGA ↓ AAACCAAGATGATATTTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG 3' (配列番号45)

プローブ4 (捕捉抗体)

5' TGCCTCCTGTCTCCGTTCT 3' (5'—ビオチン化されたもの) (配列番号30)

プローブ5 (検出抗体)

5' GGATATCACCCG 3' (アルカリホスファターゼまたはユウロピウム標識されたもの) (配列番号28)

図15は上記の実施例から得られた結果を示す棒グラフである。生成したシグナルの量(405nmでの吸光度)は標的依存的事であることが明らかになった。野生型標的(左端)については、「標的なし」の対照(右端)に存在するバックグラウンドシグナルより、はるかに大きいシグナルが得られた。しかし、標的へのハイブリッド形成時に第2のプローブ中に2塩基ループの形成を引き起こす突然変異が標的中に存在すると(中央右側)、予想外にも、シグナルの増加が起こった。さらに一層意外なことに、第2のプローブ中に3塩基ループの形成を引き起こす突然変異型標的の使用によって、シグナルの量はさらに増加した(中央左側)

）。

実施例13：三元接合部からの転写によるリボザイムの形成

この実施例ではヒトCFTR遺伝子に関するプローブの相互作用の結果として起こる新規リボ核酸の合成を実証する。生成するRNAは既知のリボザイム (Clouet-D'OrvalおよびUhlenbeck 1996, RNA 2:483-491) の配列を持ち、二重標識一本鎖オリゴヌクレオチドに結合して機能的リボザイムを形成できる。次に、その標識オリゴヌクレオチド (分子ビーコン) の特定部位での切断がシグナルを生成させることになる。

【0067】

標的 (プローブ3) への2つのオリゴヌクレオチドプローブのハイブリッド形成は三元接合部の形成をもたらす。第1のプローブは2つの領域、すなわち標的の特異領域とアーム領域からなる。第2のプローブも同様に標的の特異領域と、第1のプローブのアーム領域に一部が相補的なアーム領域からなる。第2のプローブのアーム領域は、直列に組み込まれた2つのヘキサエチレングリコール (Hex) 分子、T7 RNAポリメラーゼプロモーター配列、転写効率を最適化するための+12bp配列、シグナルの末端検出に備えたリボザイム生成用の配列も含有する。第1のプローブにはそれら2つのHex分子に相対する6個の塩基があり、それらはHexに相対して非相補ループを形成する。

【0068】

第1および第2のプローブのうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによる認識に必要な8塩基対の重なりを形成し、それがアッセイ条件でのプローブの伸長を引き起こす。伸長により、DNA依存性RNAポリメラーゼによって認識される二本鎖の機能的プロモーター配列が生成し、リボザイムの配列を持つRNAの合成 (第2のプローブを鋳型とする) が起こる。次に、生成したRNAが、蛍光体と消光体で二重に標識されたRNAオリゴヌクレオチド (プローブ4) にアニールする。リボザイム活性がプローブ4を切断し、蛍光体を消光体から分離することで、シグナルを生成させる。

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドプローブはすべて先の実施例に記述したように合成し、精製

した。

蛍光体分子と消光体分子は製造者の特許方法（Oswel社）によってオリゴヌクレオチドに取り付ける。

【0069】

リボザイム基質RNAオリゴヌクレオチドは、適当なNTP類似体を組み込むことにより、（臨床試料に存在しそうな）混入RNアーゼによる切断から保護してもよい。オリゴヌクレオチドプローブのビオチン化はビオチンホスホロアミダイトの組み込みによって達成される。

ハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成は、0.2 pmolの第1プローブ、50 fmolの第2プローブおよび0.5 pmolのプローブ3（CFTR遺伝子の標的）をT7 RNAポリメラーゼ緩衝液（最終濃度で40 mM Tris-HCl、pH 7.9、6 mM MgCl₂、2 mM スペルミジン、10 mM NaCl）と共に含むアッセイ混合物中で達成される。RNアーゼフリー蒸留水で反応液量を20 μ lにする（後の酵素とNTPの添加に備える）。対照反応は第1および第2のプローブを含むが標的（プローブ3）を含まない。

【0070】

その混合物を90℃に3分間加熱して核酸を変性させた後、10℃まで（0.1℃/秒のランピングで）冷却する。BstDNAポリメラーゼ（～8単位）、1 μ lのdNTP混合物（0.1 mMの各dNTP：2'-デオキシアデノシン5'-三リン酸（dATP）、2'-デオキシチミジン5'-三リン酸（dTTP）、2'-デオキシグアノシン5'-三リン酸（dGTP）および2'-デオキシシチジン5'-三リン酸（dCTP））、T7 RNAポリメラーゼ（40単位）および2 μ lのNTP混合物（20 mMの各NTP：アデノシン5'-三リン酸（ATP）、グアノシン5'-三リン酸（GTP）、シチジン5'-三リン酸（CTP）、ウリジン5'-三リン酸（UTP））を加え、その混合物を37℃で3時間インキュベートする。これにより、第1のプローブが伸長されて、機能的なT7 RNAポリメラーゼプロモーターが生成する。このプロモーターはT7 RNAポリメラーゼによって認識され、転写によってRNAが生成する。

合成されたRNAの検出

RNアーゼフリーDNアーゼ（アッセイ混合物10 μ lにつき1.6単位のDNアーゼ

を添加し、37℃で10分間インキュベートし、90℃で3分間加熱し、15℃に冷却)を使って、DNAをアッセイ混合物から除去する。処理したアッセイ試料の適当な希釈液各5 μ lを1対ずつ、100 μ lの緩衝液(50mM Tris-HCl, pH 7.5、20mM MgCl₂、10%エタノール)に加え、次にリボザイム基質である10pmolのプロープ4(二重標識RNA、5'-Tamra、3'-Fam)を加えた。三元接合部の標的依存的RNA産物は、対応する「ハンマーヘッド」リボザイムになるように設計される。プロープ4はそのRNA産物にアニールして機能的なリボザイムを生成させる。消光体を蛍光体から分離させる基質のリボザイム切断は、蛍光検出(Famは485nmで励起、535nmで放射)によってモニターできる。もう一つの選択肢として、基質の切断は蛍光偏光法でも測定できるだろう。基質の回転が可能なので(一つのリボザイムで50基質分子を切断しうる)、この検出工程中に、あるレベルの増幅が達成されうる。

代替実時間検出系

リボザイム基質分子が適当な緩衝液条件で伸長/転写反応混合物中に存在する場合は、実時間検出が可能だろう。

代替検出系

RNA産物は、ビオチン化された捕捉プロープを介してストレプトアビジン被覆ウェルに捕捉されうるように、捕捉配列を含んでもよい。未結合の物質を除去するための洗浄段階の後、プロープ4を加えてリボザイム切断を上述のようにモニターできるだろう。

[0071]

代替りのラベルをリボザイム基質分子に取り付けることもできるだろう。

オリゴヌクレオチドの一覧

第1のプロープ(伸長プロープ)

5' GCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGCCCACTTCGAAAT 3' (配列番号46)

第2のプロープ(鋳型プロープ)

5' GAATCTCATCAGTAGCGAGCTCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTCGAHHGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCG-リン酸 3' (配列番号47)

プロープ3

5' GATGACGCTTCTGTATCTATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGG
CATAATCCAGG 3' (配列番号22)

プローブ4 (リボザイム基質)

5' Tamura-GAAUCGAAACGCGAAAGCGUCUAGCGU-Fam 3' (配列番号48)

実施例14: 標的核酸中の欠失突然変異の検出

この例では、野生型CFTR遺伝子と3塩基欠失を持つ標的(嚢胞性線維症の原因となるΔ507)との識別が、PNA/DNAキメラであるプローブを用いてどのように達成できるかを示す。

[0072]

第1および第2プローブの標的相補部分はPNAからなり、標的非相補部分はDNAからなる。各プローブのPNA部分とDNA部分はヘキサメチレンリンカー(第1のプローブ)またはペンタメチレンリンカー(第2のプローブ)でつながれており、それらのリンカーは本発明に従って不安定化部分として働く。第2のプローブのDNAアームはT7 RNAポリメラーゼプロモーター配列、転写効率を最適化するための12bp配列、生成物の捕捉および検出用の配列も含む。

[0073]

プローブ1および2のうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによる認識に必要な7塩基対の重なりを形成し、それがアッセイ条件でのプローブ伸長を引き起こす。伸長により、T7 DNA依存性RNAポリメラーゼによって認識される二本鎖の機能的プロモーター配列が生成し、それがRNAの合成をもたらす。

[0074]

第1および第2のプローブと標的との相互作用は、突然変異型標的(プローブ4)では野生型(プローブ3)よりはるかに効率が悪いので、突然変異の識別が達成される。

オリゴヌクレオチドの調製

DNAオリゴヌクレオチドプローブは先に記述したように合成した。PNAオリゴヌクレオチドは、製造者の特許方法(PNA Diagnostics社、デンマーク・コペンハーゲン)を用いて調製した。キメラを形成させるために、PNAオリゴヌクレオチ

ドとDNAオリゴヌクレオチドを、特許方法により、ベンターまたはヘキサーメチレンリンカーを介してつないだ。オリゴヌクレオチドプローブのビオチン化は、ビオチンホスホロアミダイトの組み込みによって達成した。アルカリホスファターゼで官能化されたオリゴヌクレオチドは、製造者の特許方法 (Oswel社) を使って調製した。オリゴヌクレオチドはすべて標準的技術を使ってHPLC精製した。ハイブリッド形成させたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成は、0.2 pmolの第1プローブ、50 fmolの第2プローブおよび50 fmolのプローブ3またはプローブ4 (標的) を含有するアッセイ混合物中で、またその他の条件は実施例6に記述したようにして達成した。その混合物を90℃に3分間加熱して核酸を変性させ、ランピング (0.1℃/秒) によって47℃まで冷却した後、47℃に維持した。47℃にとどまっている試料に、Bs DNAポリメラーゼ (8単位)、1 μlのdNTP混合物 (10 mMの各dNTP: 2'-デオキシアデノシン5'-三リン酸 (dATP)、2'-デオキシチミジン5'-三リン酸 (dTTP)、2'-デオキシグアノシン5'-三リン酸 (dGTP) および2'-デオキシシチジン5'-三リン酸 (dCTP)) を加えた。その混合物を47℃で30分間インキュベートしてプローブ1を伸長させることにより、機能的なT7 RNAポリメラーゼプロモーターを生成させた。試料温度を37℃に下げ、T7 RNAポリメラーゼ (40単位) と2 μlのNTP混合物 (20 mMの各NTP: アデノシン5'-三リン酸 (ATP)、グアノシン5'-三リン酸 (GTP)、シチジン5'-三リン酸 (CTP)、ウリジン5'-三リン酸 (UTP)) を加え、その反応液を37℃でさらに180分間インキュベートした後、転写されたRNAの検出を行なった。

【0075】

合成されたRNAの捕捉と検出は実施例6に記述したように行なった。

得られた結果を図16に示す。この図は、生成したRNAを野生型標的の存在下で生成した量に対する百分率で示す棒グラフである。野生型標的 (左側) は定義として100%のRNAを生成させる。これに対し、突然変異型標的 (中央) によって生成するRNAまたは対照 (標的なし、右側) で生成するRNAの量は約5%だった。

オリゴヌクレオチドの一覧

大文字はDNAを表し、小文字はPNAを表す。C6またはC5は、それら2つの領域を結ぶヘキサ-またはペンタ-メチレンリンカーを示す。

第1のプローブ（伸長プローブ）

agaaaatatcatcttt-(C6-S'CTGAAAT3'

第2のプローブ（鋳型プローブ）

5'TGCCTCCTGTCTCCGTTCTGGATATCACCCGATGTGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTTTCAG3'
(C5-ggtgtttcctatgatg (配列番号49)

プローブ3（標的-野生型） プローブ4から欠失させた3個の塩基を下線で示してある。

5'GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTTCTTAAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG3' (配列番号22)

プローブ4（標的-欠失突然変異体） 囊性線維症の原因となるΔ507突然変異を模倣するために3つの塩基を（矢印で示す位置から）欠失させてあることを除いて、配列はプローブ3と同じである。欠失させた領域は、三元接合部中の接合部位から3塩基離れて、伸長オリゴヌクレオチド脚部の下にある。

5'GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAA↓GATATTTTCTTAAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG3' (配列番号51)

プローブ5（捕捉プローブ）

5'TGCCTCCTGTCTCCGTTCT3' (5'-ビオチン化されたもの) (配列番号30)

プローブ6（検出プローブ）

5'GGATATCACCG3' (アルカリホスファターゼまたはユウロピウム標識されたもの) (配列番号28)

実施例15：標的核酸中のSNPsの検出

この実施例では、標的核酸中の一塩基置換同士の識別のためにキメラPNA/DNAプローブを使用する。先の実施例と同様に、第1および第2のプローブは、C6またはC5リンカーで非標的相補DNA部分につながれた標的相補PNA部分を含有した。

【0076】

第2のプローブのDNAアームは、T7 RNAポリメラーゼプロモーター配列、転写

効率を最適化するための12bp配列、生成物の捕捉および検出用の配列も含有した。第1および第2のプローブのうち、互いに相補的であるが標的には相補的でない部分は、DNAポリメラーゼによる認識に必要な7塩基対の重なりを形成し、それがアッセイ条件でのプローブの伸長を引き起こす。伸長により、T7 DNA依存性RNAポリメラーゼによって認識される二本鎖の機能的プロモーター配列が生成し、それがRNAの合成をもたらす。

【0077】

第1および第2のプローブと標的との相互作用は突然変異型標的（プローブ4、5または6）では野生型標的（プローブ3）より効率がよくないので、突然変異の識別が達成される。

【0078】

オリゴヌクレオチドはすべて先の実施例に記述したように調製した。

ハイブリッド形成させたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成は、0.6 pmolの第1プローブ、5.0 fmolの第2プローブおよび0.5 pmolのプローブ3、4、5または6（標的）と、T7 RNAポリメラーゼ緩衝液を含むアッセイ混合物中で達成した。それ以降の処理（DNA伸長、転写、RNA産物の捕捉および検出）は実施例14に記述したように行なった。

オリゴヌクレオチドの一覧

大文字はDNAを表し、小文字はPNAを表す。C6またはC5は、そのPNA/DNAをつなぐヘキサーまたはペンターメチレンリンカーを示す。

第1のプローブ（伸長プローブ）

gaaaaatcatctcttt-C6-5'CTGAAAT3'

第2のプローブ（鋳型プローブ）

5'TGCCTCCTGTCTCCGTTCTGGATATCACCCGATGTGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCA63'
'-C5-ggtgttttcctatgatg（配列番号49）

プローブ3（標的-野生型）

5'GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTTCTTTAATGGTGCCAGG
CATAATCCAGG3'（配列番号22）

プローブ4（一塩基置換を持つ標的）一塩基が変化している（下線部）ことを除

いて、配列はブロープ3と同じである。この突然変異は、三元接合部中の接合部位から10塩基離れて、鋳型ブロープ脚部の下にある。

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATCGGAAACACCAAGATGATATTTCTTTAATGGTGCCAGG CATAATCCAGG 3' (配列番号51)

ブロープ5 (一塩基置換を持つ標的) 一塩基が変化している (下線部) を除いて、配列はブロープ3と同じである。この突然変異は、三元接合部中の接合部位から8塩基離れて、伸長ブロープ脚部の下にある。

5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAGATGCTATTTCTTTAATGGTGCCAGG CATAATCCAGG 3' (配列番号52)

ブロープ6 (一塩基置換を持つ標的) ブロープ4と5で変化させた2つの位置のそれぞれで一塩基が変化している (下線の位置) を除いて、配列はブロープ3と同じである。5' GATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATCGGAAACACCAAGATGCTATTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGG 3' (配列番号53)

ブロープ7 (捕捉ブロープ)

5' TGCCTCCTTGCTCTCCGTTCT 3' (5'-ビオチン化されたもの) (配列番号30)

ブロープ8 (検出ブロープ)

5' GGATATCACCCG 3' (アルカリホスファターゼまたはユウロビウム標識されたもの) (配列番号28)

得られた結果を図17に示す。この図は、生成したRNAを野生型標的の存在下で生成した量に対する%で示す棒グラフである。野生型標的 (左側) は定義として100%のRNAを生成させる。これに対し、突然変異型標的 (1、2および3と記した部分) または対照 (標的なし、右側) で生成するRNAは有意に少ない。

実施例16: 三元接合部での最適化された伸長/転写

この実施例はいくつかのアッセイ条件の最適化に関する。要するに、実施例9を、その実施例で使用したものと同一ブロープを使って繰り返したが、アッセイ条件は基本的に実施例14に記述したとおりにした。ハイブリッド形成された鋳型ブロープ (第2のブロープ) の伸長を、以下に記述するように高または低濃度のdNTP類を使って行なった。

ハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドからのRNAの合成

ハイブリッド形成は実施例14に記述したように0.2 pmolの第1プローブ、50 fmolの第2プローブおよび50 fmolのプローブ3 (CFTR遺伝子の標的)を含むアッセイ混合物中で行なった。しかし、BstDNAポリメラーゼ(8単位)による伸長は、0.1 mMまたは10 mM dNTP類のdNTP混合物1 μ lを使って行なった。転写は実施例14に記述したように行なった。次に、合成されたRNAの捕捉と検出を、やはり実施例14に記述したように行なった。典型的な結果を図18に示す。

【0079】

図18は、高濃度(500 μ M) (1と2)または低濃度(5 μ M) (3と4)のdNTP類で、標的の存在下(1と3)または不在下に生成するRNAの量(単位fmol)を示す棒グラフである。標的の不在下では、事実上RNAは生成しないが、標的の存在下ではどちらのdNTP濃度でもかなりの量が生成する。しかし生成するRNAは、低いdNTP濃度の方が有意に多い(2倍以上の増加)。dNTP類の濃度が高すぎるとRNAポリメラーゼが阻害されるようである。このタイプのアッセイではおそらく1~10 μ Mぐらいの濃度がdNTP類に関しては最適だろう。

【0080】

配列表

(1) 一般情報

(1) 出願人

(A) 名称: サイトセル・リミテッド

(B) ストリート: トリニティ・ウェイ、ソマービル・コート、ユニット・

6

(C) シティ: パンベリー、アダーベリー

(E) 国籍: イギリス

(F) 郵便番号(ZIP): 0X17 3SN

(G) 電話番号: (01295) 810910

(H) ファクシミリ番号: (01295) 812333

(11) 発明の名称: 修飾核酸プローブおよびその使用

(111) 配列の総数: 53

(iv) コンピュータで読取可能な形式

(A) 媒体：フロッピーディスク

(B) コンピュータ：IBM PCコンパティブル

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：Patent IN Release # 1. 0、Ver

sion # 1. 30 (EPO)

(2) 配列番号1の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：12塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：配列番号1

ATCGTCAGTC CC

12

(2) 配列番号2の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：12塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：配列番号2

GCTCTCTCTC CC

12

(2) 配列番号3の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：12塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：配列番号3

ATCCTCTCTC CC 12

(2) 配列番号4の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 12塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号4

GTTCTCTCTC CC 12

(2) 配列番号5の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 12塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号5

GATGTGTCTC CC 12

(2) 配列番号6の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 12塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号6

GTTGTGTCTC CC 12

(2) 配列番号7の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 12塩基
- (B) 型: 核酸

- (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (x i) 配列の記載：配列番号 7
 ATCTCTGTC CC 12
- (2) 配列番号 8 の情報
 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ：12塩基
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (x i) 配列の記載：配列番号 8
 GCTCTGTC CC 12
- (2) 配列番号 9 の情報
 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ：12塩基
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (x i) 配列の記載：配列番号 9
 GTTCTGTC CC 12
- (2) 配列番号 10 の情報
 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ：12塩基
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (x i) 配列の記載：配列番号 10
 GTTGTCGTC CC 12
- (2) 配列番号 11 の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 41塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号11

GCTCAGTTTA CTAGTGCCAT TTGTTCCGCC ACGGGGCGGA G 41

(2) 配列番号12の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 63塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号12

GGATATCACC CGATGTGCGG CGCTCCGCCG CNNAGTGTTT CGTAGGGCTT TCCCCCACTG 60

TTT 63

(2) 配列番号13の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 71塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号13

AACTGAAAGC CAAACAGTGG GGGAAAGCCC TACGAACCAC TGAACAAATG GCACTAGTAA 60

ACTGAGCCAG G 71

(2) 配列番号14の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 17塩基

(B) 型: 核酸

- (C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(x i) 配列の記載：配列番号 1 4
GGATATCACC CGATGTG 17
- (2) 配列番号 1 5 の情報
(i) 配列の特徴
(A) 長さ：1 5 塩基
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(x i) 配列の記載：配列番号 1 5
TACTAGTGCC ATTTG 15
- (2) 配列番号 1 6 の情報
(i) 配列の特徴
(A) 長さ：4 9 塩基
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(x i) 配列の記載：配列番号 1 6
AAACAGAAGC ATTCTCAGAA ACTTCTCAGT GATGGCCAC GCGGCGAG 49
- (2) 配列番号 1 7 の情報
(i) 配列の特徴
(A) 長さ：6 5 塩基
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(x i) 配列の記載：配列番号 1 7
GGATATCACC CGATGTGCGG CGCTCCGCCG CNNTTTCAT TCAGCTCATG GAGTTGAACA 60
CTTCC 65

(2) 配列番号18の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 80塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号18

CTATGAAAGG AAGTGTTCAG CTCATGAGC TGAATGCAA CATCACTGAG AAGTTTCTGA 60
 GAATGCTTCT GTTGTATTT 80

(2) 配列番号19の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 15塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号19

AAACTTCTCA GTGAT 15

(2) 配列番号20の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 43塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号20

TGGCACCATT AAAGAAAATA TCATCTTTGC CCACCCGGCG GAG 43

(2) 配列番号21の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 67塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号21

GGATATCACC CGATGTGCGG CGCTCCGCCG GNNGGTGTTT CCTATGATGA ATATAGATAC 60
AGAAGCG 67

(2) 配列番号22の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：80塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号22

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAACACCA AAGATGATAT TTCTTTAAT 60
GGTGCCAGGC ATAATCCAGG 80

(2) 配列番号23の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：15塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号23

TTAAGAAAA TATCA 15

(2) 配列番号24の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：52塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号24

GGATATGECT GGCACCATTA AAGAAAATAT CATCTTTGCC CACCCGGCGG AG 52

(2) 配列番号25の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 71塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号25

GGATATCACC CGATGTGCGG CGCTCCGCCG GNNNNNNGGT GTTCCTATG ATGAATATAG 60

ATACAGAAGC G 71

(2) 配列番号26の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 37塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号26

GGCACCATTA AAGAAAATAT CATCTNNCCA CCCGGCG 37

(2) 配列番号27の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 89塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号27

GGATATCACC CGCGGTCGT TCGTGGTTTT GCGTGCGGCG CTCCGCCGGG TGGGCGGTGT 60

TTCCTATGAT GAATATAGAT ACAGAAGCG 89

(2) 配列番号28の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 12塩基
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (x1) 配列の記載: 配列番号28
- GGATATCACC CG 12
- (2) 配列番号29の情報
- (1) 配列の特徴
- (A) 長さ: 62塩基
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (x1) 配列の記載: 配列番号29
- CCCTGTCTCC GTTCTGGATA TCACCCGATG TGTCTCCCTA TAGTGAGTCG TATTAATTTC 60
 AG 62
- (2) 配列番号30の情報
- (1) 配列の特徴
- (A) 長さ: 20塩基
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (x1) 配列の記載: 配列番号30
- TGCCCTCCTG TCTCCGTTCT 20
- (2) 配列番号31の情報
- (1) 配列の特徴
- (A) 長さ: 36塩基
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号 3 1

GGCACCATTAAAGAAATATCATCTNCCACCCGGCG 36

(2) 配列番号 3 2 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 68 塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号 3 2

GGATATCACC CGATGTGCGG CGCTCCGCCG GGTGGNTGTT TCCTATGATG AATATAGATA 60
CAGAAGCG 68

(2) 配列番号 3 3 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 35 塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号 3 3

TTAAAGAAAA TATCATCTTT GCCCACCCTGG CGGAG 35

(2) 配列番号 3 4 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 65 塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号 3 4

GGATATCACC CGATGTGCGG CGCTCCGCCG GNTGTTTCC TATGATGAAT ATAGATACAG 60
AAGCG 65

(2) 配列番号 3 5 の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 42塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号35

GCCTGGCACC ATTAAAGAAA ATATCATCTT TGCCACGAA AT 42

(2) 配列番号36の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 96塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号36

CCTGTCTCC GTTCTGGATA TCACCGATG TGTCTCCCTA TAGTGAGTCG TATTAATTTC 60

NNGGTGTTTC CTATGATGAA TATAGATACA GAAGCG 96

(2) 配列番号37の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 82塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号37

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAAACACCT TAAAGATGAT ATTTTCTTTA 60

ATGGTGCCAG GCATAATCCA GG 82

(2) 配列番号38の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 77塩基
- (B) 型: 核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号38

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAACACCG ATGATATTTT CTTTAATGGT 60

GCCAGGCATA ATCCAGG 77

(2) 配列番号39の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：34塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号39

GGGCTGACCC TCCCGGGGGC TGCGCCACG AAAT 34

(2) 配列番号40の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：91塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号40

CCTGTCTCC GTTCTGGATA TCACCCGATG TGTCTCCCTA TAGTGAGTCG TATTAATTC 60

NNACTCTCGT CCTGCTGGGA AGGGCGATAG T 91

(2) 配列番号41の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：95塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号41

TGAGTGCTCA GAGGAGGACT ATCGCCCTTC CCAGCAGGAC GAGTGCAGCC CCCGGGAGGG	60
TCAGCCCGTC TGCAGCCAGC GGGGCGAGTG CCTCT	95

(2) 配列番号42の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 95塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号42

TGAGTGCTCA GAGGAGGACT ATCGCCCTTC CCAGCAGGAC GAATGCAGCC CCCGGGAGGG	60
TCAGCCCGTC TGCAGCCAGC GGGGCGAGTG CCTCT	95

(2) 配列番号43の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 77塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号43

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAACAAGAG ATGATATTTT CTTTAATGGT	60
GCCAGGCATA ATCCAGG	77

(2) 配列番号44の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 78塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号44

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAACCAAA GATGATATTT TCTTTAATGG	60
TGCCAGGCAT AATCCAGG	78

(2) 配列番号45の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 78塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号45

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAAACAAA GATGATATT TCTTAAATGG 60
TGCCAGGCAT AATCCAGG 78

(2) 配列番号46の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 45塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号46

GCCTGGCACC ATTAAGAAA ATATCATCTT TGCCCACTTC GAAAT 45

(2) 配列番号47の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 91塩基

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(x i) 配列の記載: 配列番号47

GAATCTCATC AGTAGCGAGC TCTCTCTCCC TATAGTGAGT CGTATTAATT TCGAANNNGT 60
GTTTCCTATG ATGAATATAG ATACAGAAGC G 91

(2) 配列番号48の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ: 27塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号 48

GAAUCGAAAC GCGAAAGCGU CUAGCGU

27

(2) 配列番号 49 の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：67 塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号 49

TGCCCTCTTG TCTCCGTTCT GGATATCACC CGATGTGTCT CCTATAGTG AGTCGTATTA

60

ATTTCAG

67

(2) 配列番号 50 の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：77 塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x i) 配列の記載：配列番号 50

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTATCATA GGAACACCA AAGATATTTT CTTTAATGGT

60

GCCAGGCATA ATCCAGG

77

(2) 配列番号 51 の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ：80 塩基

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号51

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATC GGAAACACCA AAGATGATAT TTTCTTTAAT	60
GGTGCCAGGC ATAATCCAGG	80

(2) 配列番号52の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 80塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号52

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAAACACCA AAGATGCTAT TTTCTTTAAT	60
GGTGCCAGGC ATAATCCAGG	80

(2) 配列番号53の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 80塩基
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(x1) 配列の記載: 配列番号53

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATC GGAAACACCA AAGATGCTAT TTTCTTTAAT	60
GGTGCCAGGC ATAATCCAGG	80

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: Cytoce11 Limited
 (B) STREET: Unit 6, Somerville Court, Trinity Way
 (C) CITY: Adderbury, Banbury
 (D) COUNTRY: United Kingdom
 (E) POSTAL CODE (ZIP): OX17 3SN
 (G) TELEPHONE: (01295) 810810
 (H) TELEFAX: (01295) 882333

(ii) TITLE OF INVENTION: Modified Nucleic Acid Probes and Uses Thereof

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 53

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 12 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

ATGCTCAGTC CC

12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 12 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

GCTCTCTCTC CC

12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 12 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

ATCTCTCTC CC 12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

GTCTCTCTC CC 12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

GATGTCTCTC CC 12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

GTGTCTCTC CC 12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

- (x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:
ATCGTGTGTC CC 12
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:
(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:
ACTCTGTGTC CC 12
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:
(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:
GTTCTGTGTC CC 12
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:
(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:
GTTGTGTGTC CC 12
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:
(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 41 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:
GCTGAGTTA CTAGTGCC? TTGTTGGCC AGCGGCGGA G 41

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 63 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

GGATATCACC CGATGTGGG CGCTCGCGG GHWAGTGGTT CGTAGGGCTT TCCCCACTG	60
TTT	63

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 71 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

AACTGAAGAC CAACAGTGG GYSAAAGCC TAGGAACAC TBAACAATG GCACTAGTAA	60
ACGAGGCCAG G	71

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 17 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

GGATATCACC CGATGTG	17
--------------------	----

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 16 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

TACTAGTCCC ATTTC	16
------------------	----

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 49 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:

AAACAGAGC ATTCTCAGAA ACTTCTCAAT GATGGCCAC GGGGGGAG 49

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 65 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:

GGATATCAGC GATATGCGG CGCTCGCG CMTTTGCAT TCAGTCATG GAGTTGACAA 60
 CTTC 65

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 60 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18:

CTATGAAAGG AAGTGTCAA CTCATGAGC TGAATGCATA CATCATGAG AAGTTCTGA 60
 GAATGCTTCT GTTTGATTT 60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 15 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 19:

AACTTCTCA GTGAT 15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 43 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20:

TGGACCACTT AAGAGAAATA TCACTTTTGC CAAACGGGG GAG 43

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 67 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21:

GGATATCACC CGATGTGGG CAGTCGCGG GNNGGTGTTC CATTATGTA ATATATATAC 60

AGAAGCG 67

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 80 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22:

GATGAGGCTT CTGTATCTAT ATTATCATA GGAACACCA AAGATGATAT TTCTTTTAAT 60

GGTCCAGGC ATAATCCAGG 80

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 15 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23:

TTAAGAAAA TATCA 15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 52 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 24:

GATATGCT GGCACCATTA AAGAAATAT CATCTTTCG CACCGCGG AG 52

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 71 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 25:

GGATATCAC CGATGTGCG CGCTGCGCG GNNNNNNGT GTTTCCTATG ATGAATATAG 60

ATACAGAAGC G 71

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 37 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 26:

GGCACCATTA AAGAAATAT CATCTTTCG CCGCGG 37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 89 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 27:

GGATATCAC CGCGCTGCT TGTGTGTTT GCGTGCAGG CTCGCCGG TGGCGGTGT 60

TTCCTATGAT GAATATAGAT ACAGAAGCG 89

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 28:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 32 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 28:
 GGAATACACG 32
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 29:
 (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 62 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 29:
 CCTGTCTCC GTTCTGAGATA TCACCGAAG TGTCTCCCTA TAGTGAGTCG TATTAATTTC 60
 AG 62
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 30:
 (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 20 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 30:
 TGGCTCCTTG TCTCGTTCT 20
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 31:
 (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 36 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 31:
 GGCACCATTA AAGAAATAT CATCTNCCAC CCGGCG 36
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 32:
 (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 68 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 32:

GGATATACC CGATGTGGG CBTCCGCC GGTGNTGTT TCCTATGATG AATATAGATA 60
CAGAAGCG 60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 33:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 35 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 33:

TTAAGAAAA TATCATCTTT GCGACCGGG CGAG 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 34:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 65 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 34:

GGATATCACC GGATGTGGG CBTCCGCC GNTGTGTTCC TATGATGAAT ATAGATACAG 60
AAGCG 65

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 35:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 42 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 35:

GGCTGCACC ATTAAGAAA ATATCATCTT TGCCACGAA AT 42

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 36:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 96 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 36:

CTTGCTCC GTTCGGATA TCACCGATG TGTCGCCA TAGTGATCG TAATAATTC	60
MMGGTGTTC CTATGATGAA TATAGATCA GAACG	96

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 37:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 82 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 37:

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAAACACT TAAAGATGAT ATTTCTTTA	60
ATGGTGCCAG GCATAATCCA GG	82

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 38:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 77 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 38:

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTCATCATA GGAAACACG ATGATATTTT CTTTAATGCT	60
GCCAGGATA ATCCAGG	77

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 39:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 34 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 39:

GGGCTGACCC TCCGGGGGC TGCGCCAGG AAT	34
------------------------------------	----

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 40:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 91 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 40:

CCTTGTCTCC GTTCTGGATA TCACCGGATG TGTCCTCCTA TAGTGAGTCG TATTAAATTC	60
NNACTCTCTGT CCTGCTGGGA AGGGCGATAG T	91

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 41:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 95 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 41:

TGAGTGTCTCA GAGGAGGACT ATGCGCCTTC CCAGCAGAGC GAGTCAGCC CCGGGAGGG	60
TCAGCCCGTC TGCAGCCAGC GGGCGAGTG CCTCT	95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 42:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 95 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 42:

TGAGTGTCTCA GAGGAGGACT ATGCGCCTTC CCAGCAGAC GAATGAGCC CCGGGAGGG	60
TCAGCCCGTC TGCAGCCAGC GGGCGAGTG CCTCT	95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 43:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 77 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 43:

GATGAGGCTT CTGTATCTAT ATTGCATATA GGAACAAGG ATGATATTTT CTTTAAATGT	60
GCCAGGCGATA ATCCAGG	77

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 44:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 78 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 44:

GATGAGCCTT CTGTATCTAT ATTATCATA GGAAACAAA GATGATATT TCTTAAATG	60
TGCCAGGCAT AATCCAGG	78

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 45:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 78 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 45:

GATGAGCCTT CTGTATCTAT ATTATCATA GGAAACAAA GATGATATT TCTTAAATG	60
TGCCAGGCAT AATCCAGG	78

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 46:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 45 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 46:

GCCTGCCACC ATTAAGAAA ATATCATCTT TGCGCACTTC BAAAT	45
--	----

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 47:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 91 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 47:

GAATCTCATC AGTAGCGAC TCTCTCTCC TATAGTAGT CBTATTAAAT TGGAAATGAT	50
--	----

GTTTCCTATG ATGAATATAG ATACAGAGC G

91

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 48:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 27 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 48:

GAAGCGAAG GCGAAGCGG CAGCGG

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 49:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 67 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 49:

TSCCTCTTG TCTCGTCTT GATATACAC CGATGTGTCT CCTATAGTG ATCGTATTA

60

ATTTCAG

67

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 50:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 77 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 50:

GATGAGCTT CTGTATCTAT ATTATCATA GGAACACCA AGATATTTT CTTTAATGT

60

GCAGGCGATA ATCCAGG

77

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 51:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 50 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 51:

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTTCATC GGAACACCA AAGATGATAT TTTCTTTAAT	60
GGTGCCAGGC ATAATCCAGG	80

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 52:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 80 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 52:

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTTCATC GGAACACCA AAGATGCTAT TTTCTTTAAT	60
GGTGCCAGGC ATAATCCAGG	80

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 53:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 80 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 53:

GATGACGCTT CTGTATCTAT ATTTCATC GGAACACCA AAGATGCTAT TTTCTTTAAT	60
GGTGCCAGGC ATAATCCAGG	80

【図面の簡単な説明】

【図1】 不安定化部分が「鎖型」第2プローブ中に存在する三元接合部を示す。

【図2】 Hex二量体からなる不安定化部分の化学構造を示す。

【図3】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図4】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図5】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図6】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を

示す棒グラフである。

【図7】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図8】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図9】 不安定化部分が「鋳型」第2ブローブ中に存在する三元接合部を示す。

【図10】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図11】 A～Dは、本発明に従って実施したアッセイ方法の略図である。

【図12】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図13】 A～Cは、本発明に従って実施したアッセイ方法の略図である。

【図14】 A～Dは、本発明に従って実施したアッセイ方法の略図である。

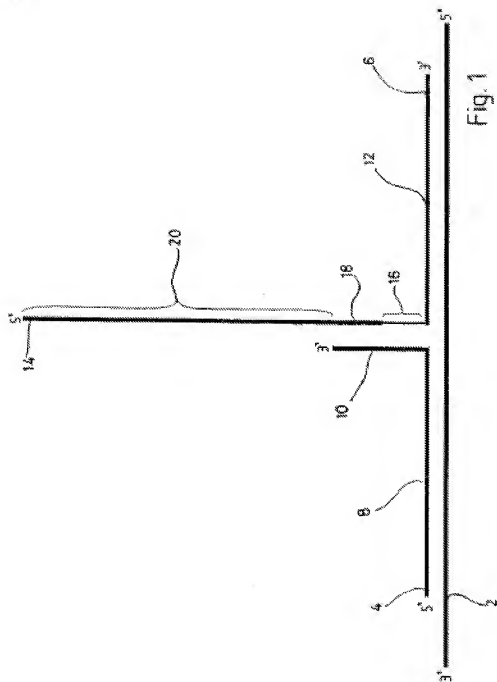
【図15】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図16】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

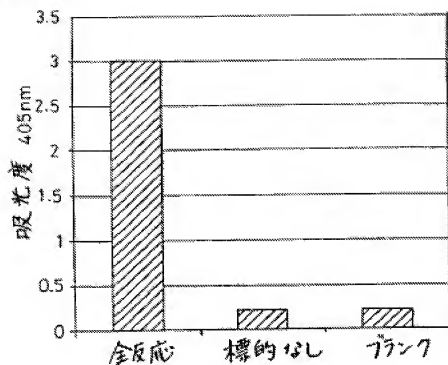
【図17】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

【図18】 本発明に従って実施した種々のアッセイ方法から得られた結果を示す棒グラフである。

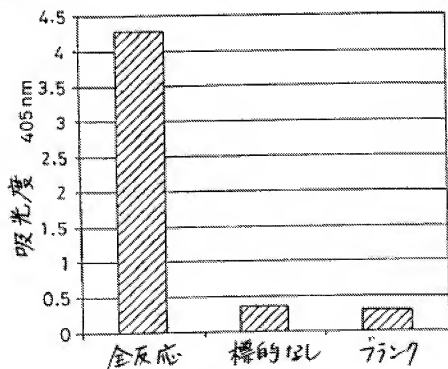
【図1】



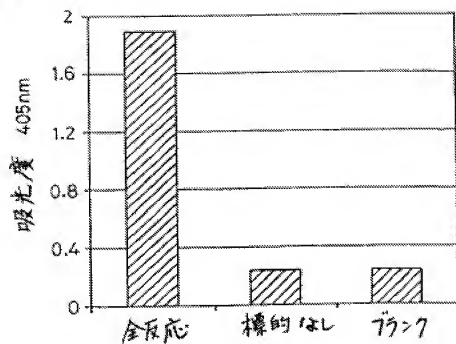
【図3】



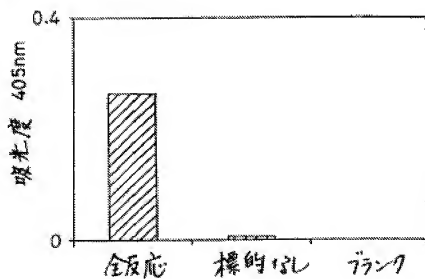
【図4】



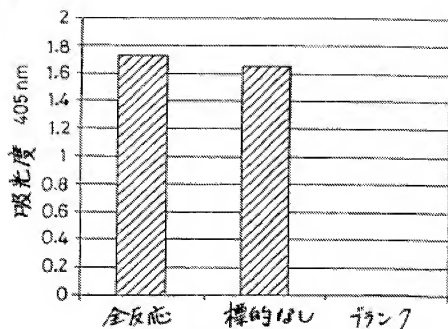
【図5】



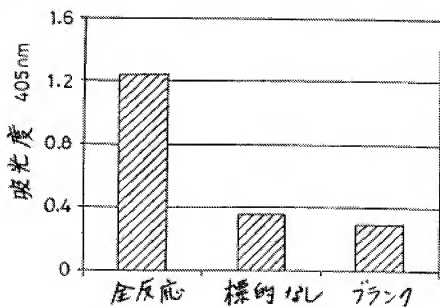
【図6】



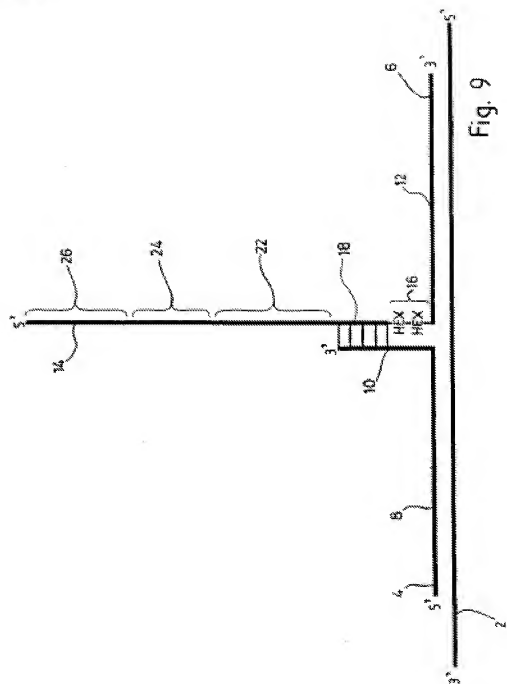
【図7】



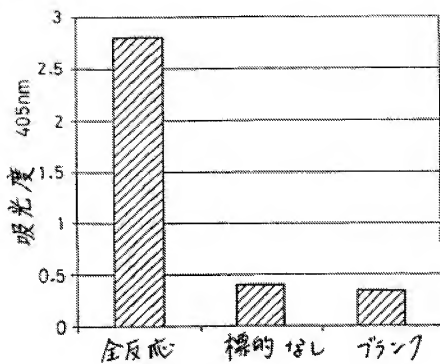
【図8】



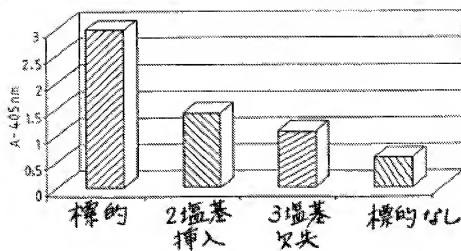
【圖9】



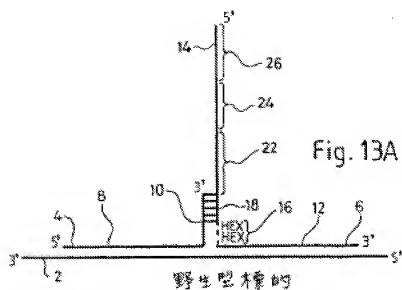
【図10】



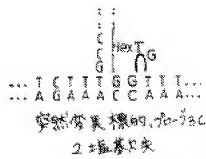
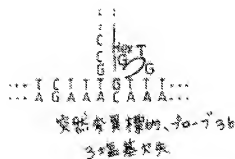
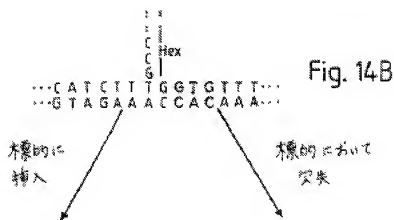
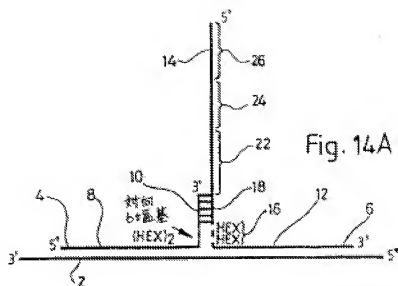
【圖12】



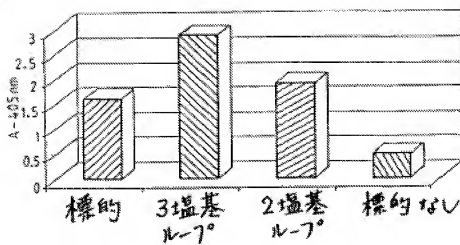
【圖13】



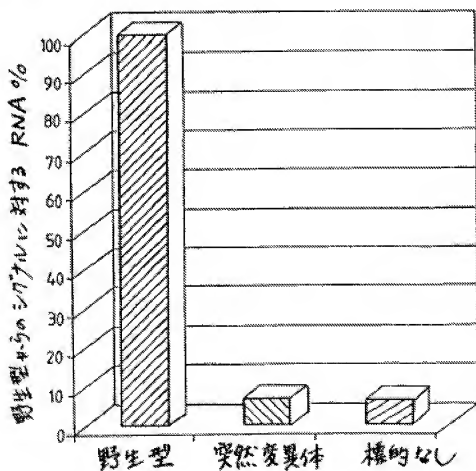
【図14】



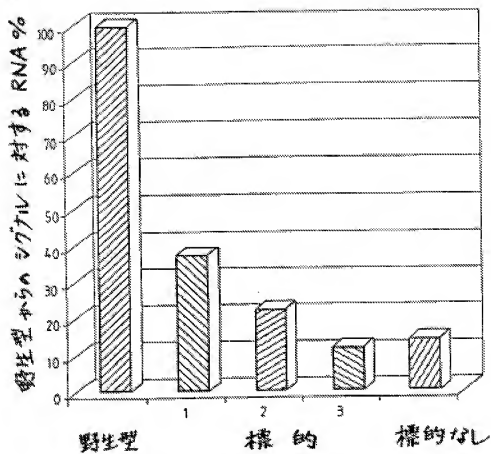
【図15】



【図16】



【図17】



【圖18】

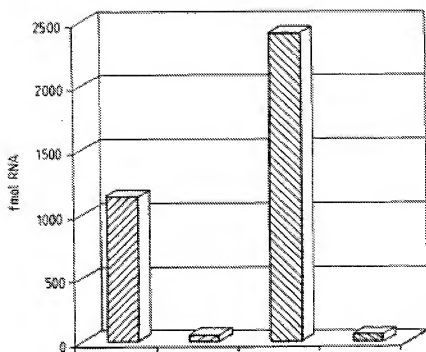


Fig. 18

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年3月21日(2000. 3. 21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 試料を第1および第2のプロープと接触させること（ここで、第1のプロープは、関心のある配列に相補的であってそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列に非相補的である部分とを含み、また第2のプロープは、関心のある配列に相補的であってそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列には非相補的であるが第1のプロープの関心のある配列に非相補的な部分には相補的である部分とを含み、第1および第2のプロープは、第1および第2のプロープの相補的部分が互いにハイブリッド形成できるように、隣接して、または実質的に隣接して、関心のある配列にハイブリッド形成できるようになっている）、(b) 第2のプロープを鋳型とし、核酸ポリメラーゼを使って第1のプロープの伸長を引き起こすこと、および(c) 関心のある配列の存在を示すために、第1のプロープの伸長を直接または間接的に検出することからなる、試料中の関心のある核酸配列を検出する方法であって、第1および/または第2のプロープが、相互のプロープと塩基対形成できずそのために関心のある配列の不在下での第1のプロープと第2のプロープのハイブリッド形成を妨げる、核酸塩基以外の不安定化部分を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 第1および第2のプロープがDNA、RNA、PNA、LNA、またはそれらの組み合わせからなる請求項1に記載の方法。

【請求項3】 不安定化部分がヘキサエチレングリコール、ペンタメチレンまたはヘキサメチレンからなる請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 不安定化部分が第2のプロープ中に存在する請求項1、2ま

たは3のいずれか一つに記載の方法。

【請求項5】 第1または第2のプロープが、関心のある配列へのハイブリッド形成によって第1または第2のプロープ中および／または関心のある配列中に不対核酸塩基のループが形成されるようになっている請求項1～4のいずれか一つに記載の方法。

【請求項6】 関心のある配列への第1または第2のプロープのハイブリッド形成によって第1または第2のプロープ中および／または関心のある配列中に2または3不対核酸塩基のループが形成される請求項5に記載の方法。

【請求項7】 第1および第2のプロープを既知の核酸配列を持つ対照核酸と接触させる対照反応を含む請求項1～6のいずれか一つに記載の方法。

【請求項8】 第1のプロープの伸長が活性な核酸プロモーターの形成をもたらす請求項1～7のいずれか一つに記載の方法。

【請求項9】 第1のプロープの伸長がT3、T7またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーターの形成をもたらし、それが第2のプロープの少なくとも一部の多数のRNAコピーの転写を可能にする請求項8に記載の方法。

【請求項10】 活性な核酸プロモーターから合成された核酸の検出が第1のプロープの伸長の間接的検出を可能にする請求項8または9に記載の方法。

【請求項11】 活性な核酸プロモーターによって引き起こされる転写がリボザイム活性を持つ核酸配列の合成をもたらす請求項8、9または10のいずれか一つに記載の方法。

【請求項12】 核酸が検出に先立って増幅工程にかけられる請求項1～11のいずれか一つに記載の方法。

【請求項13】 第1のプロープの伸長の直接的または間接的結果として合成された核酸がさらなる核酸プロープとのハイブリッド形成によって検出される請求項1～12のいずれか一つに記載の方法。

【請求項14】 さらなる核酸プロープが分子ビーコンを構成する請求項13に記載の方法。

【請求項15】 第1のプロープの伸長の直接的または間接的結果として合成された核酸が固体表面で捕捉される請求項1～14のいずれか一つに記載の方

法。

【請求項16】 関心のある核酸配列を検出する方法で使用するための一対の核酸プローブであって、その対の第1のプローブは、関心のある配列に相補的でありそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列に非相補的である部分とを含み、またその対の第2のプローブは、関心のある配列に相補的でありそれゆえそれにハイブリッド形成できる部分と、関心のある配列には非相補的であるが第1のプローブの関心のある配列に非相補的な部分には相補的である部分とを含み、第1および第2のプローブは、第1および第2のプローブの相補的部分が互いにハイブリッド形成できるように、隣接して、または実質的に隣接して、関心のある配列にハイブリッド形成できるようになっており、その第1および/または第2のプローブが、そのプローブの対の相互の要素と塩基対形成できずそのために関心のある配列の不在下での第1のプローブと第2のプローブのハイブリッド形成を妨げる、核酸塩基以外の不安定化部分を含むことを特徴とする一対の核酸プローブ。

【請求項17】 請求項1～15のいずれか一つに記載の方法で使用するための請求項16に記載の一対のプローブ。

【請求項18】 請求項16に記載の一対のプローブと適当な包装手段とを含む、試料中の関心のある核酸配列の存在を検出する際に使用するためのキット。

【請求項19】 請求項1～15の何れか一つの方法を実施する際に使用するための請求項18に記載のキット。

【請求項20】 下記の1つ以上をさらに含む請求項18または19に記載のキット：DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、リボ-またはデオキシリボ-ヌクレオチド三リン酸類（標識されたもの、または標識されていないもの）、標識試薬類、検出試薬類、緩衝剤類。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

No. 99/00259
PCT/GB 99/00259

Classifications of documents considered to be relevant

Category	Reference to document with indication of relevant passages or relevant passages	Relevance
A	WO 96 23903 A (FLANDEURIN GIL; LASEROPHYS ARLEA (SE)) 8 August 1996 (1996-08-08) examples	3
A	IVAGT S ET AL: "MOLECULAR BEACONS: PROBES THAT FLUORESCENCE UPON HYBRIDIZATION" 916/TECHNOLOGY, vol. 14, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 303-308, WPO00196024 ISBN: 0735-222X cited in the application the whole document.	14
A	WO 94 29465 A (IMCLOWE SYSTEMS INC) 22 December 1994 (1994-12-22)	
A	WO 94 03637 A (SYNTEX INC) 17 February 1994 (1994-02-17)	

No. 99/00259/00259 of 99/00259/00259

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

File No. 2001/00000000

PCT/JP 99/03269

Patent documents cited in abstract	Publication date	Patent family members	Publication date
JP 0552931 A	28-07-1993	AU 665062 B	14-12-1995
		AU 1586693 A	01-09-1993
		CA 2128536 A	05-08-1993
		JP 7509139 T	06-06-1995
		WO 9315102 A	05-08-1993
		US 5451503 A	19-09-1995
		US 5429413 A	13-06-1995
WO 9306240 A	01-04-1993	AT 152778 T	15-05-1997
		AU 672267 B	03-10-1996
		NO 2550692 A	27-04-1993
		CA 2114913 A	01-04-1993
		DE 69219627 S	12-06-1997
		DE 69219627 T	04-09-1997
		DK 696927 T	15-09-1997
		EP 0660927 A	16-04-1995
		ES 2101116 T	01-07-1997
		JP 6510669 T	01-12-1994
EP 0361083 A	04-06-1990	DE 69926484 S	26-06-1996
		DE 69926484 T	05-12-1996
		EP 0707676 A	17-04-1996
		JP 7257898 A	18-10-1990
		US 5703171 A	09-06-1996
		US 5472040 A	05-12-1995
WO 9322661 A	11-11-1993	AU 691082 B	21-08-1997
		AU 4222493 A	29-11-1993
		AU 4923897 A	19-02-1998
		CA 2135173 A	11-11-1993
		EP 0687256 A	16-03-1994
		JP 7506258 T	13-07-1995
		US 5554516 A	10-09-1996
		US 5866729 A	30-03-1999
WO 9623903 A	08-08-1996	CA 2211686 A	08-08-1996
		EP 0873766 A	21-10-1996
		JP 10513545 T	15-12-1996
WO 9429465 A	22-12-1994	US 5866739 A	08-12-1996
		AU 7207204 A	03-01-1995
		CA 2163957 A	22-12-1994
		EP 0702729 A	27-03-1996
		JP 9505255 T	21-01-1997
WO 9406337 A	17-02-1994	AT 152380 T	15-05-1997
		CA 2144450 A	17-02-1994
		DE 69310179 S	26-05-1997
		DE 69310179 T	31-07-1997
		DK 652973 T	16-09-1997
		EP 0662974 A	17-09-1995
		ES 2104163 T	01-10-1997
		JP 7509365 T	19-09-1995
		US 5679612 A	21-10-1997
		US 5583879 A	04-11-1997

Note: PCT/JP 99/03269, dated 09/09/99

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 アッセンバーク、レネ

イギリス、オー・エックス・16 8・ビ
イ・ゼット オックスフォードシャー、バ
ンベリー、マルボロー・ロード、1

(72) 発明者 マーシュ、ピーター

イギリス、シェ・ブイ・31 2・エイ・ジ
イ ウォーウィックシャー、リーミングト
ン・スパ、イーグル・ストリート、4

(72) 発明者 モック、グラハム・アンドリュース

イギリス、オー・エックス・9 3・ダブ
リュ・キュー オックスフォードシャー、
デイル、リー・パーク・エスデイト、アス
トリー・ロード、2

(72) 発明者 レイ、トゥレボーン・ダンカン

イギリス、オー・エックス・14 5・ジェ
イ・エイチ オックスフォードシャー、ア
ビングドン、ゲインズボロー・ダリー、
15

(72) 発明者 ソラム、スーザン・デボラ

イギリス、シェ・ブイ・4 8・エフ・ビ
イ コベントリー、フリーバーン・コウズ
ウェイ、37

(72) 発明者 カーディー、ドナルド・レオナルド・ニコラス

イギリス、エヌ・エヌ・11 6・ユー・エ
ヌ ノーザンプトンシャー、アストン・
ル・ウォールズ、ブラックスミス・レー
ン、トゥリンラン (所在地なし)

ドターム(参考) 4B024 AA20 CA09 HA11
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52
QR08 QR55 QR62 QS02 QS25
QS34

【要約の続き】

第1のプロープと第2のプロープのハイブリッド形成を妨げる不安定化部分を含むことを特徴とする方法が開示される。